

Etablierung der Methodik zur Darstellung des extrazellulären Proteoms in Biofilmen eines mucoiden Stammes von *Pseudomonas aeruginosa*

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grad eines
Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation

von Diplom-Chemiker
Sascha Broekman

aus
Mülheim an der Ruhr

Datum der Einreichung: 31.08.2007

Datum der mündlichen Prüfung: 03.12.2007

Referent: Prof. H.C. Flemming
Korreferentin: HD B. Siebers

Duisburg, 2007

Ich danke an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Hans-Curt Flemming für die Überlassung dieses herausfordernden Forschungsthemas sowie den Glauben an mich.

Dr. Jost Wingender danke ich für die zahlreichen und umfangreichen wissenschaftlichen Diskussionen, welche diese Arbeit erst ermöglicht haben.

HD Dr. Bettina Siebers danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Den Mitarbeitern des Biofilm-Centers danke ich für die seelische Unterstützung, wenn mal wieder etwas nicht geklappt hat. Naja, also fast immer ;-)

Den Mitarbeitern des Forschungszentrums Karlsruhe danke ich für die freundliche Unterstützung bei meinen Forschungsaufenthalten. Besonders Katharina Fund danke ich für die Einweisung in die Identifikation der Proteine mittels MALDI-TOF und Boris Kühl danke ich für die Hilfe bei der Benutzung des Spektrometers.

And also many thanks to Sarah R. Schooling for the beautiful TEM-Pictures.

ZUSAMMENFASSUNG	10
1 EINLEITUNG	12
1.1 Biofilme	12
1.2 Extrazelluläre Proteine	17
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.4 Alginat	19
1.5 Zellwandaufbau Gram-negativer Bakterien wie <i>P. aeruginosa</i>	21
1.6 Protein-Sekretion	21
1.7 Analyse von Proteinen	23
1.7.1 Quantitative Analyse	23
1.7.2 Spezieller Nachweis von Enzymen mittels Aktivitätsmessungen:	24
1.7.3 Protein-Trennung	25
1.7.3.1 Isoelektrische Fokussierung	26
1.7.3.2 Färbung	28
1.7.3.2.1 Coomassie-Färbung:	29
1.7.3.2.2 Silber-Färbung:	29
1.7.3.2.3 Fluoreszenz-Färbung:	30
1.7.4 Proteomics	30
1.8 Zielsetzung:	33
2 MATERIAL	34
2.1 Bakterienstämme:	34
2.2 Nährmedien:	34
2.3 Chemikalien:	35
2.4 Kommerzielle Chemikalien-Mixturen und Kits:	36
2.5 Geräte:	37
2.6 Computer-Software und Datenbanken:	38
3 METHODEN	39
3.1 Mikrobiologische Methoden	39
3.1.1 Anzucht von Biofilmen von <i>P. aeruginosa</i>	39
3.1.2 Gewinnung der EPS	39
3.1.2.1 Aufarbeitung für die isoelektrische Fokussierung	39
3.2 Biochemische Methoden	40

3.2.1 Bestimmung der Polysaccharidkonzentration.....	40
3.2.1.1 Bestimmung der Gesamtkohlenhydratkonzentration (Dubois et al., 1956)	40
3.2.1.2 Bestimmung der Uronsäurekonzentration (Filisetti-Cozzi und Carpita, 1991)	41
3.2.2 Bestimmung der Alginatlyase-Aktivität. (nach Lange et al., 1988)	42
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (modifiziert nach Lowry et al., 1951).	43
3.3 Gelelektrophoretische Methoden	44
3.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese.....	44
3.3.1.1 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Fertiggelen	45
3.3.2 Gelelektrophorese zur Bestimmung von Protease-Aktivitäten.....	46
3.3.2.1 Färbung mit Coomassie-brillantblau-Färbekit „Simply Blue“.....	48
3.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese	48
3.3.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	48
3.3.3.2 Gelelektrophorese	49
3.3.3.3 Silberfärbung nach Blum (1987)	53
3.3.4. Massenspektrometrische Proteinidentifikation	55
3.3.4.1 Enzymatischer Verdau	55
3.3.4.1.1 Coomassie-brillantblau-gefärbte Gele:.....	55
3.3.4.1.2 Silbergefärbte Gele.....	56
3.3.4.2 MALDI-Massenspektrometrische Analyse	58
3.4 Biochemisch präparative Methoden.....	59
3.4.1 Reinigung von bakteriellen Alginaten(modifiziert nach Wingender, 1984).....	59
3.4.2 Teilreinigung einer Alginat-Lyase von <i>Klebsiella aerogenes</i> Typ 25 (modifiziert nach Lange et al, 1989)	60
3.4.3 Isolierung der Proteine der äußeren Membran (modifiziert nach Poxton et al., 1985).....	61
3.5 Physikalisch-Chemische Methoden	61
3.5.1 Gelpermeationschromatographie von zellfreien EPS-Lösungen	61
3.5.1.1 Sephacryl S-500 HR	61
3.5.1.2 Sephacryl S-200 HR	63
3.5.2. Viskosimetrie	64
4 ERGEBNISSE	65
4.1 Allgemeine biochemische Charakterisierung der EPS	65
4.2 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nativer EPS	66

4.2.1 Zymogrammgelelektrophorese zum Nachweis proteolytischer Aktivität	67
4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese nativer EPS	68
4.4 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	69
4.5 Ausfällung des Alginats mit Kalziumchlorid	70
4.6 Gelpermeationschromatographie von EPS	71
4.6.1 Verwendung von Sephacryl S-500 HR	72
4.6.2 Verwendung von Sephacryl S-200 HR	73
4.7 Enzymatischer Alginatabbau durch Lyasebehandlung	74
4.7.1 Untersuchung der vorbehandelten Proben für die Eignung zur 2D-GE	77
4.8 Ultrafiltration	78
4.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE)	79
4.9.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	80
4.9.2 IEF-Puffer	80
4.9.3 IEF-Programm	81
4.9.4 Erfassung des Proteinprofils	81
4.9.4.1 Ermittlung der optimalen Aufgabemenge an EPS-Lyophilisat	81
4.9.4.2 Profil extrazellulärer Proteine aus Biofilmen von <i>P. aeruginosa</i>	81
4.9.4.3 Vergleich von Proteinen der äußeren Membran und extrazellulärer Proteine	84
4.9.4.4 Zeitabhängigkeit der extrazellulären Proteinexpression	85
4.10 Proteinidentifikation	91
4.11 Einfluss von Kalziumionen auf die Expression extrazellulärer Proteine	94
4.11.1 Entwicklung innerhalb von 72 h	96
5 DISKUSSION	98
5.1 Allgemeines	98
5.2 Biochemische Zusammensetzung der EPS	99
5.3 1D-Gelelektrophorese der extrazellulären Proteine	99
5.4 2D-GE-Versuche mit nativer EPS-Lösung	101
5.4.1 Abtrennung der Kohlenhydrate durch Fällung	102
5.4.1.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure	102
5.4.1.2 Fällung des Alginats durch Ca^{2+} -Ionen	103
5.4.1.3 Säulenchromatographie (Gelfiltration)	103
5.4.1.4 Störung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten durch Argininzusatz	104

5.4.1.5 Enzymatischer Abbau des Alginats durch Alginat-Lyase	106
5.4.1.6 Trennung durch Rückhaltung der Polysaccharide bei der Ultrafiltration...	107
5.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese extrazellulärer Proteine von <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> in der Literatur	108
5.6 Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese in dieser Arbeit.....	110
5.7 Abhängigkeit der Proteinexpression von Ca-Ionen im Nährmedium.....	113
5.8 Identifikation der Proteine	114
5.8.1 Cytoplasmatisch lokalisierte Proteine:	115
5.8.2 Periplasmatisch lokalisierte Proteine:.....	115
5.8.3 Membranproteine.....	116
5.8.4 Extrazellulär lokalisierte Proteine:.....	117
5.9 Interpretation der gefundenen Proteine:	119
5.9.1 Membranvesikel.....	120
5.10 Fazit	122
5.11 Ausblick	123
6 LITERATUR	124

Abkürzungsverzeichnis

2D-GE	2-Dimensionale Gelelektrophorese
A	Absorption
A. deion.	Deionisiertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	[3-(3-Cholanamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure(di-Natriumsalz)
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Imobilisiertes pH Gradienten Gel (Fertigstreifen der Fa. Biorad)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Massenspektrometrie
MW	Molare Masse
OM	Äußere Membran
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PIA	Pseudomonas-Isolierungs-Agar
pI	Isoelektrischer Punkt
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z. A.	Zur Analyse

Abbildungsverzeichnis

- | | | |
|----|------|---|
| 1 | S.13 | Ergebnis der Modellberechnung des Energieminimums zwischen Alginat und der Lipase LipA von <i>P. aeruginosa</i> |
| 2 | S.15 | Schematische Biofilmbildung |
| 3 | S.20 | Monomerbausteine des Alginats |
| 4 | S.20 | Beispiele für verschiedene mögliche Strukturen der Alginatblöcke in einem Alginatmakromolekül |
| 5 | S.21 | Schematischer Aufbau der Zellwand eines Gram-negativen Bakteriums |
| 6 | S.26 | Kräfteverhältnis eines geladenen Teilchens im elektrischen Feld. |
| 7 | S.27 | Schematische Darstellung der isoelektrischen Fokussierung |
| 8 | S.67 | SDS-PAGE von Proteinen einer zellfreien EPS-Lösung |
| 9 | S.68 | Zymogramm-Gel mit Gelatine als Substrat |
| 10 | S.69 | Silbergefärbte 2D-GE von 2 mg EPS-Lyophilisat eines 24-h-Biofilms von <i>P. aeruginosa</i> |
| 11 | S.71 | 2D-GE von 2 mg EPS-Lyophilisat, gewonnen nach Abtrennung von Alginat durch Ausfällung mit CaCl_2 . |
| 12 | S.72 | Elutionsprofil einer mit Sephacryl S-500 HR gepackten Chromatographiesäule von EPS |
| 13 | S.73 | Elutionsprofil einer mit Sephacryl S-500 HR gepackten Chromatographiesäule von EPS mit Arginin |
| 14 | S.74 | Elutionsprofil einer mit Sephacryl S-200 HR gepackten Chromatographiesäule von EPS |
| 15 | S.78 | Anwendung von Alginat-Lyasen verschiedener Spezies auf EPS-Sterilfiltraten zur 2D-GE |
| 16 | S.82 | 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 24 h alten Biofilm von <i>P. aeruginosa</i> SG81 im pH-Bereich zwischen 3 und 10 |
| 17 | S.83 | 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 24 h alten Biofilm von <i>P. aeruginosa</i> SG81 im pH-Bereich zwischen 7 und 10 |
| 18 | S.84 | 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 24 h alten Biofilm von <i>P. aeruginosa</i> SG81 im pH-Bereich zwischen 4 und 7 |
| 19 | S.85 | Vergleich zweier 2D-Gele mit dem Fokussierbereich pH 4-7 von Proteinen der äußeren Membran mit extrazellulären Proteinen aus den EPS eines Biofilms von <i>P. aeruginosa</i> SG81 |
| 20 | S.86 | 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 48 h alten Biofilm von <i>P. aeruginosa</i> SG81 im pH-Bereich zwischen 3 und 10 |

- 21 S.87 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 48 h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 4 und 7
- 22 S.88 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 72 h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 3 und 10
- 23 S.89 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 72 h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 4 und 7
- 24 S.90 Vergleich der Bildausschnitte A-F der Abbildungen 16-23 für EPS-Proteine von *P. aeruginosa* SG81
- 25 S.92 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem 48 h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 3 und 10 mit eingezeichneten analysierten Spots
- 26 S.95 Vergleich von 2D-Gelen extrazellulärer Proteine aus 24 h alten Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 3 und 10 bei Kalziumzusatz
- 27 S.96 Vergleich von 2D-Gelen extrazellulärer Proteine aus 24 h alten Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 4 und 7 bei Kalziumzusatz
- 28 S.97 Vergleich von 2D-Gelen extrazellulärer Proteine aus 48 h und 72 h alten Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 4 und 7 bei Kalziumzusatz
- 29 S.97 Vergleich von 2D-Gelen extrazellulärer Proteine aus 48 und 72 h alten Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 im pH-Bereich zwischen 3 und 10 bei Kalziumzusatz
- 30 S.102 Ausschnitt eines 2D-Gels mit einer unvollständigen IEF
- 31 S.105 Modellberechnung des Energieminimums zwischen Alginate und der Lipase LipA von *P. aeruginosa*.
- 32 S.108 Schematische Darstellung der Abhängigkeit des Ionenradius von Polyacrylsäure in wässriger Lösung unterschiedlicher Ionenstärke
- 33 S.110 Vergleich zwischen einem mit Coomassie-Brillantblau gefärbten und einem mit Silber gefärbten 2D-Gel extrazellulärer Proteine von 48 h alten Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81
- 34 S.120 Schematische Darstellung der Bildung von Membranvesikeln
- 35 S.121 TEM-Aufnahme eines Biofilms von *P. aeruginosa* SG81
- 36 S.122 TEM-Aufnahme der EPS eines Biofilms von *P. aeruginosa* SG81

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Isolierung und Identifizierung der extrazellulären Proteine des mucoiden Bakteriums *P. aeruginosa* SG81 im Biofilm. Die biochemische Analyse der EPS ergab eine hohe Polysaccharidkonzentration, welche die direkte Analyse der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) unmöglich machte. Nicht erfolgreich waren die folgenden biochemischen Methoden zur Aufarbeitung und Anreicherung proteinhaltiger Lösungen:

- Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure
- Fällung des Alginats mit Kalziumionen
- Enzymatischer Abbau des Alginats mit Alginat-Lyasen und Entfernung der Abbauprodukte durch Dialyse
- Gelpermeationschromatographische Auftrennung der EPS-Bestandteile

Für die erfolgreiche Durchführung der 2D-GE wurden die, bei 36 °C auf *Pseudomonas*-Isolierungsagar gewachsenen, 24-72 h alten Biofilme mit Kochsalzlösung unter Rühren homogenisiert, die Bakterien durch Zentrifugation entfernt und die EPS-Lösung gegen A. deion. dialysiert. Die Abtrennung des hochmolekularen Alginats erfolgte durch Ultrafiltration mit einer Membran der Porengröße 100 kDa, welche die Lösung so trennte, dass das Alginat im Überstand blieb und die Proteine größtenteils mit dem Filtrat die Membran passierten. Zur Störung intermolekularer Wechselwirkungen wurde vor der Dialyse L-Arginin hinzugesetzt und vorhandene proteolytische Aktivität durch den Zusatz eines Proteaseinhibitors gehemmt. Die isoelektrische Fokussierung dieser Lösung war erfolgreich und mit der anschließenden Gelelektrophorese konnten durch Silberfärbung über 100 verschiedene Proteinspots im Größenbereich zwischen 16 bis 98 kDa und einem isoelektrischen Punkt zwischen 3,5 und 10 angefärbt werden.

Das so dargestellte Sekretom eines mucoiden, im Biofilm gewachsenen *P. aeruginosa*-Stamms unterscheidet sich in weiten Bereichen von den in der Literatur veröffentlichten Sekretomen nichtmucoider Stämme von planktonischen *P. aeruginosa*. Die extrazellulären Proteine unterschieden sich größtenteils auch von den isolierten Proteinen der äußeren Membran dieses, im Biofilm gewachsenen, Bakterienstamms. Im zeitlichen Verlauf, bis das Biofilmalter drei Tage betrug, gab es nur geringe Veränderungen in der Zusammensetzung des Sekretoms. Durch

Kalziumzusatz im Nährmedium, welcher die physikalischen Eigenschaften des Biofilms stark verändert, erfolgte ebenfalls nur eine geringe Veränderung des Sekretoms.

Mit der massenspektrometrischen Untersuchung der aufgetrennten Proteine gelang die Identifikation von Proteinen in 21 unterschiedlichen Spots. Es zeigte sich, dass extrazellulär auch Proteine zu finden sind, deren Lokalisation in der Zelle als cytoplasmatisch, periplasmatisch oder membrangebunden angenommen wird. Eine Untersuchung mit der Transmissionselektronenmikroskopie ergab, dass im Biofilm sowie in den EPS Membranvesikel vorhanden sind. Die Vesikelbildung ist für mucoide *P. aeruginosa*-Stämme noch nicht beschrieben worden und wurde hiermit als weiterer Sekretionsmechanismus für Proteine von Bakterien dieses Phänotyps nachgewiesen.

Viele der identifizierten Proteine der EPS sind bereits in der Literatur für planktonische Bakterienkulturen von *P. aeruginosa* extrazellulär beschrieben worden. Es konnten aber auch einige Proteine identifiziert werden, die extrazellulär bis jetzt noch nicht nachgewiesen wurden.

Mit dieser Arbeit wurde eine Methode geschaffen, das extrazelluläre Proteom eines mucoiden *Pseudomonas aeruginosa*-Stamms im Biofilm darzustellen und zu untersuchen.

1 Einleitung

1.1 Biofilme

Die meisten Mikroorganismen leben nicht einzeln in ihrer Umgebung, sondern bilden Zellaggregate. Costerton et al. (1987) postulieren sogar, dass mehr als 99% der Mikroorganismen aggregiert vorkommen. Diese Aggregate können an Grenzflächen wie z. B. fest-flüssig oder fest-gasförmig vorkommen, aber auch als Flocken in Meeren existieren (Flemming, 1991). Eine Definition von Biofilmen besagt, dass es sich hierbei um irreversibel an Oberflächen, Grenzflächen oder aneinander angeheftete Populationen von Mikroorganismen handelt, welche von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben sind, die von ihnen selbst produziert wurden. Im Gegensatz zu planktonischen Zellen haben sie einen veränderten Phänotyp, was sich auch in ihrer Wachstumsrate und ihrer Gentranskription widerspiegelt (Donlan und Costerton, 2002). Die EPS, zu denen Polysaccharide, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und teilweise auch Huminstoffe gezählt werden (Wingender et al., 1999; Allison et al., 2003), sind stark hydratisiert und verhindern damit ein Austrocknen der Zellen. Hauptbestandteil des Biofilms ist Wasser (Characklis, 1990). Die Zusammensetzung der EPS ist jedoch höchst unterschiedlich. Es wurde nachgewiesen, dass verschiedene Stoffgruppen die Hauptbestandteile der EPS sein können. Polysaccharid-dominierte Biofilme (Sutherland, 1984) sind ebenso möglich wie proteinreiche (Frølund et al., 1996), nukleinsäurereiche (Palmgren und Nielsen, 1996) oder lipidreiche (Gehrke et al., 1998). Außerdem können exogene partikuläre organische oder anorganische sowie gelöste Substanzen darin eingebettet sein (Flemming und Wingender, 2002). Es konnte dabei eine zeitliche Fluktuation nachgewiesen werden (Decho et al., 2005), Aufbau und Zusammensetzung des Biofilms ändern sich dabei. Gemeinsam ist allen Biofilmen aber, dass die Mikroorganismen Nutzen daraus ziehen, aggregiert zu leben und nicht planktonisch. Die Bakterien verlieren zwar ihre freie Beweglichkeit, allerdings bietet die Lebensweise im Biofilm unter anderem eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika (Costerton et al., 1999) und der Genaustausch wird vereinfacht (Wolfaard et al., 1999 sowie Hausner und Wuertz, 1999). Durch die EPS können gelöste Stoffe aus der Wasserphase im Biofilm akkumuliert werden, welche den Zellen auch als

Nährstoffquelle dienen können, da sie sorptive Eigenschaften haben (Späth et al., 1998).

Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen sorgen für einen Zusammenhalt des Biofilms. Zwischen Polysacchariden und Proteinen sind sie weit verbreitet. So fanden Wang et al. (2006) Wechselwirkungen zwischen Fimbrien und Cellulose bei der Biofilmbildung von *E. coli* sowie Larsen et al. (eingereicht) die weite Verbreitung amyloider Adhäsine in natürlichen Biofilmen.

Die Wechselwirkungen von extrazellulären Enzymen und Polysacchariden wurden von Wingender et al. (1999) untersucht. Dabei konnten Schutzwirkungen der Polysaccharide auf die Enzyme nachgewiesen werden.

Durch „Molecular-Modelling“ vorgenommene Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Alginat und dem Enzym Lipase von *P. aeruginosa*, welche im Vakuum und in einer Wasser-Box durchgeführt wurden, zeigten eine Anziehung zwischen den an der Oberfläche des Enzyms befindlichen Aminosäuren und dem Alginat (Tielen et al., in Vorbereitung). Eine Anlagerung des Enzyms an Alginat mit diesen Seitenketten ist, wie in Abb. 1 dargestellt, energetisch vorteilhaft.

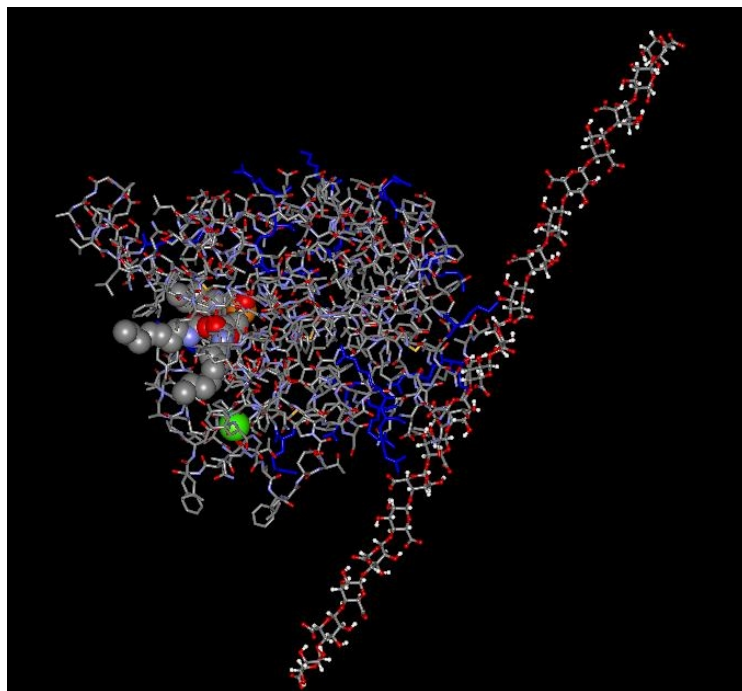


Abb. 1 Ergebnis der Modellberechnung des Energieminimums zwischen Alginat (im Bild rechts) und der Lipase LipA (links) von *P. aeruginosa*. Die Lipase ist mit einem Inhibitormolekül im aktiven Zentrum dargestellt. Positiv geladene Aminosäurereste des Enzyms sind blau dargestellt (Tielen et al., in Vorbereitung).

Dieses Phänomen der Bindung eines Enzyms an ein Polysaccharid bedeutet einen weiteren Vorteil für die bakterielle Lebensweise im Biofilm. Vom Bakterium ausgeschiedene Enzyme werden nicht an den freien Raum einer Wasserphase gegeben. Die von dem Bakterium mit hohem Energie und Materialaufwand hergestellten Makromoleküle verbleiben in der Nähe und sind dort aktiv, es profitiert also selbst davon.

Biofilme sind häufig von einer hohen mikrobiellen Diversität geprägt. Durch die innerhalb eines Biofilms herrschenden stark unterschiedlichen Umgebungsbedingungen entstehen unterschiedliche Habitate für die verschiedensten Organismen. So können innerhalb eines Biofilms starke pH- und Sauerstoffkonzentrationsgradienten existieren (DeBeer et al., 1994). Dies kann als Mikronische für manche Spezies dienen, die sonst in dieser Umgebung gar nicht existieren könnten (Costerton et al., 1995).

Biofilmbildung bedeutet eine große Veränderung für ein planktonisches Bakterium, was man zum Beispiel dadurch erkennen kann, dass sich die zellinterne Proteinexpression beim Übergang zur sessilen Form stark ändert (Sauer et al., 2002).

Die Biofilmbildung kann in verschiedene Phasen unterteilt werden:

Die erste wird Anheftungsphase genannt (Characklis, 1990; Dunne, 2002). Planktonische Zellen heften sich an einer Oberfläche an. An dieser Oberfläche kann durch irreversible Adsorption von organischen Makromolekülen an einer Oberfläche ein „conditioning film“ bestehen, welcher sich teilweise schon nach wenigen Minuten bildet (Loeb und Neihof, 1975). Die Mikroorganismen können nun sowohl an ihm anheften als auch direkt an der Oberfläche. Die zuerst reversible Anheftung wird nach einigen Minuten zu einer irreversiblen. Dabei ist die Beweglichkeit der Zellen in dieser Phase noch nicht völlig eingeschränkt. Eine Beweglichkeit z. B. durch Typ IV Pili bleibt an der Oberfläche erhalten. Danach bilden sich in der Reifungsphase 1 genannten Phase durch EPS verknüpfte Mikrokolonien aus (Sauer et al., 2002). Diese werden immer größer, Makrokolonien entstehen. In der Reifungsphase 2 (Sauer et al., 2002) bildet sich der vollständige Biofilm aus. In der letzten Phase (Dispersionsphase) werden Zellen („Schwärmerzellen“) und ganze Stücke aus dem Biofilm abgelöst („sloughing off“), die sich dann weiter dispergieren und zu einem neuen Biofilm ausbilden können. Für *P. aeruginosa* wurde dies vermutlich durch

einen programmierten Zelltod und die Expression lytischer Phagen (Webb et al., 2003) nachgewiesen.

Die folgende Abbildung erläutert diese Abläufe der Biofilmentwicklung schematisch:

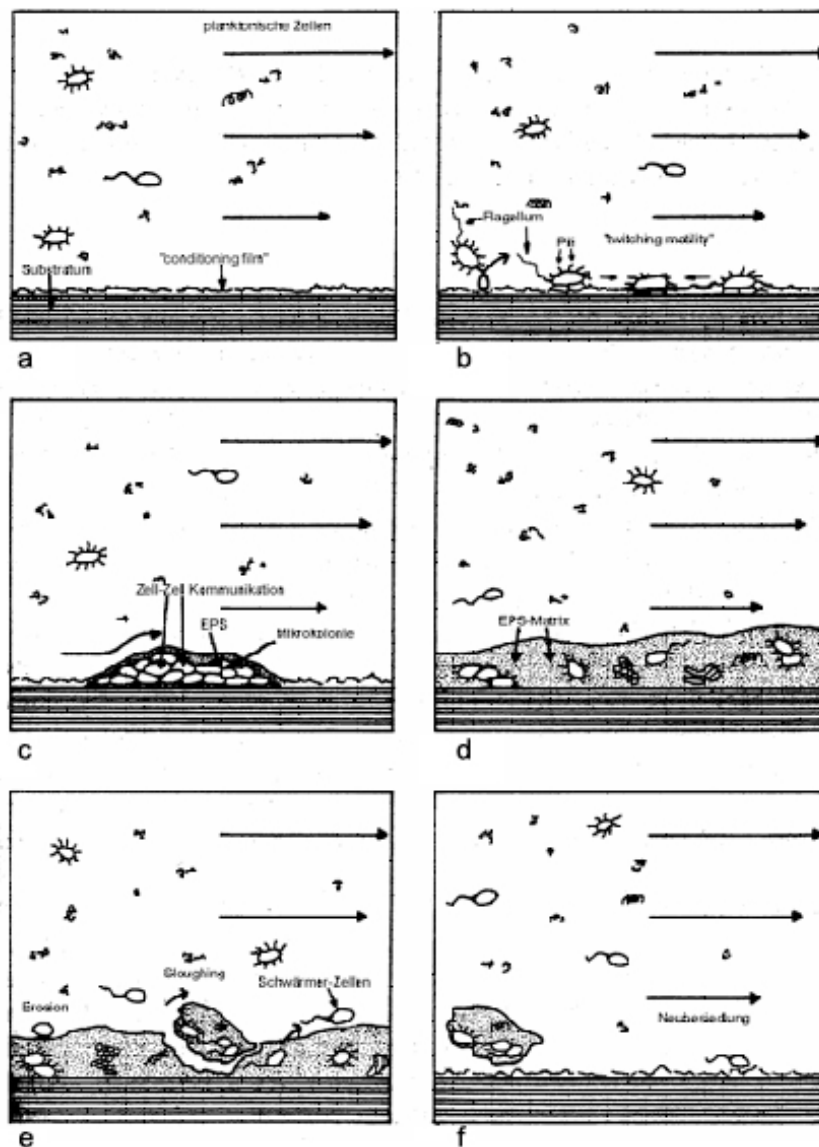


Abb. 2 Schematische Biofilmbildung. a) Ausbildung eines conditioning film, b) reversible und irreversible Anheftung, c) EPS-Produktion und Bildung von Mikrokolonien, d) reifer konfluenter Biofilm, e) Ablösung einzelner Bestandteile des Biofilms „sloughing“ und aktive Ablösung einzelner „Schwärmerzellen“, f) weitere Ausbreitung und Neubesiedlung (aus Flemming und Wingender, 2001).

Biofilme bilden komplexe dreidimensionale Strukturen. Ihre Architektur wird meist maßgeblich durch extrazelluläre Proteine (Frølund et al., 1996) oder Polysaccharide bestimmt. So konnte nachgewiesen werden, dass Polysaccharide in Biofilmen von *P. aeruginosa* die mechanische Stabilität bestimmen und verantwortlich für das

viskoelastische Verhalten des Biofilms sind (Wloka et al., 2006). In neuerer Zeit wird allerdings auch die Rolle anderer Moleküle wie Lipide und vor allem Nukleinsäuren in der Strukturgebung der Biofilme diskutiert (Branda, 2005; Flemming und Wingender, 2002). Hydrophobe Wechselwirkungen, Verknüpfungen durch mehrwertige Kationen sowie Verschlaufungen von Biopolymeren spielen dabei eine große Rolle für die Festigkeit (Flemming und Wingender, 2002; Klausen et al., 2004).

Extrazelluläre DNA konnte in neuerer Zeit mit netzwerkartiger Struktur im Biofilm nachgewiesen werden, wobei erkannt wurde, dass sie zwar große Ähnlichkeit mit der genomischen DNA des Bakteriums hat, sich aber dennoch auch von ihr unterscheidet (Böckelmann et al., 2006). Für *P. aeruginosa* konnte dabei eine Eisenkonzentrationsabhängigkeit für die Ausscheidung entdeckt werden (Yang, 2007). In Biofilmen von *Staphylococcus aureus* hingegen hatte die extrazelluläre DNA genomischen Charakter (Rice et al., 2007), sie stammt aus lysierten Zellen.

Die Zelldichte im Biofilm ist stark unterschiedlich. Es gibt Kanäle, die den konvektiven Stofftransport ermöglichen. Die Unterschiede können durch physikalische äußere Einflüsse (z. B. starke Strömung) oder durch das Vorhandensein von höheren Organismen (Protozoen), die den Biofilm abweiden (grazing), entstehen. (Pedersen, 1990). Es konnte dazu in einem Modell gezeigt werden, dass dieses Abweiden das Biofilmwachstum und vor allem die EPS-Produktion beeinflusst (Joubert et al., 2006).

Eine Übersicht der einzelnen Stoffgruppen der EPS und ihrer Funktion im Biofilm ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Übersicht der einzelnen EPS-Bestandteile hinsichtlich ihrer Art und Aufgabe im Biofilm (aus Flemming et al., eingereicht).

Effekt and Art der EPS-Komponente	Aufgabe im Biofilm
Konstruktiv Neutrale Polysaccharide	Strukturkomponente
Sorptiv Geladene oder hydrophobe Polysaccharide	Ionenaustausch, Sorption
Aktiv Extrazelluläre Enzyme	Polymerabbau
Oberflächenaktiv a) Amphiphile b) Membranvesikel	Oberflächeninteraktionen Ausschleusung aus der Zelle, Sorption
Informativ a) Lektine b) Nukleinsäuren	Spezifität, Erkennung Genetische Information, Strukturgebung
Redox-aktiv Huminstoffe	Elektronendonator oder -akzeptor
Nährend Verschiedene Polymere	Quelle von Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor

1.2 Extrazelluläre Proteine

Proteine gehören zu den Hauptkomponenten der EPS (Flemming und Wingender, 2002). Untersuchungen an extrazellulären Proteinen wurden früher nur in begrenztem Umfang durchgeführt. Meist wurden dabei lediglich Enzymaktivitäten untersucht oder Virulenzfaktoren analysiert. Zudem sind diese Untersuchungen früher ausschließlich in Flüssigkulturen gemacht worden. Erst seit wenigen Jahren werden diese Untersuchungen auch auf Biofilme bezogen. Nouwens et al. (2002) zeigten erstmals Analysen, welche die Gesamtheit der sekretierten Proteine zweier verschiedener Stämme von *P. aeruginosa* in Flüssigkulturen darstellen. Diese Analysen zeigen, dass eine Vielzahl von Proteinen extrazellulär vorkommt, wobei dabei nicht nur Enzyme, sondern auch eine Reihe anderer Proteine nachgewiesen

werden konnten, sowie einige, deren Funktion noch unbekannt ist. Auf diese sogenannten „hypothetischen Proteine“ konnte anhand der Genomsequenz (Stover et al., 2000) indirekt zurückgeschlossen werden. Sie konnten massenspektrometrisch identifiziert werden.

Erst die Information über die Art der vorkommenden Proteine ermöglicht eine Aussage über den Sinn ihrer Anwesenheit im extrazellulären Raum. Extrazelluläre Enzyme beispielsweise dienen den Bakterien dadurch, dass sie Makromoleküle spalten und so einerseits für die Zelle verfügbar machen können, außerdem kann dadurch ein Um- und Abbau der EPS stattfinden. Die Enzyme können aber auch andere Zellen schädigen und dadurch eine Vorteilssituation im Kampf ums Überleben bringen.

Strukturgebende Proteine sind wahrscheinlich auch extrazellulär anzutreffen, ebenso lektinartige (zuckerbindende), welche möglicherweise den dreidimensionalen Aufbau des Biofilms festigen (Higgins und Novak, 1997). So häufen sich beispielsweise die Anzeichen dafür, dass Lektine strukturgebend am Aufbau von Biofilmen von *P. aeruginosa* beteiligt sind (Tielker et al., 2005).

Zum Verständnis und zur Erforschung des Phänomens Biofilm wird im Labor häufig auf einen Modellorganismus zurückgegriffen: *Pseudomonas aeruginosa*. Als Reinkultur ist er in der Lage, innerhalb recht kurzer Zeit reproduzierbare Biofilme auszubilden. Er ist häufiger Gegenstand der Forschung und einer der am besten untersuchten Mikroorganismen überhaupt. Mit ihm versucht man die komplexen Vorgänge eines natürlichen Biofilmes zu simulieren. Dabei werden die vielfältigen Interaktionen einer Mischkultur vernachlässigt um die grundlegenden Prinzipien innerhalb eines Biofilms verstehen zu können (Bakke et al., 1990). Allerdings kann anhand der Phänomene, die mit diesem Bakterium nachgewiesen werden können, nur sehr selten ein allgemeiner Rückschluss auf andere Biofilme gemacht werden. Die Mechanismen der einzelnen Organismen, mit unterschiedlichen Umwelteinflüssen umzugehen, sind zwar häufig in den Grundzügen ähnlich, unterscheiden sich aber meist in Detail.

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Dieses Bakterium ist ein anspruchsloses, Gram-negatives und monotrich begeißeltes Stäbchen und weit verbreitet. Stammspezifisch können sich verschiedene Kolonietypen ausbilden: klassisch, coliformen-ähnlich, rau, runzelig, mucoid und winzig (Philips 1969).

Das Genom des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 wurde als einer der ersten prokaryotischen Organismen komplett sequenziert (Stover et al., 2000). Es weist eine für Prokaryoten relativ hohe Anzahl (5570) an offenen Leserahmen (ORF) für die Proteinbiosynthese auf. Die ist etwa vergleichbar mit einem einfachen eukaryotischen Organismus wie *Saccharomyces cerevisiae* (ca. 6200).

P. aeruginosa hat aufgrund seiner fakultativen Pathogenität hygienische Relevanz. Er gilt als ein Hauptauslöser von nosokomialen, d. h. im Krankenhaus erworbenen Infektionen (Botzenhart und Döring, 1993). Des Weiteren wird häufig über Infektionen von Brandwunden und dem Harnwegstrakt berichtet. Er zeigt dabei eine hohe Resistenz gegen Antibiotika (Salysers und Whitt, 2002).

Problematisch ist dieses Bakterium bei der Erbkrankheit Mukoviszidose (Cystische Fibrose). Das Lungenepithelgewebe solcher Patienten wird bei Infektionen mit *P. aeruginosa* zerstört (Dockter, 1997). Für die Biofilmbildung bzw. die Anheftung auf biotischen Strukturen ist dabei wahrscheinlich das hypothetische Polysaccharid Psl mitverantwortlich (Ma et al., 2006). Im Sputum der Mukoviszidosepatienten können dabei häufig mucoide *P. aeruginosa*-Stämme gefunden werden. Der mucoide Phänotyp zeichnet sich durch eine Überproduktion des Polysaccharids Alginate aus (Govan, 1990). Lange Zeit wurde angenommen, dass mucoide Stämme lediglich bei Infektionen zu finden sind. Die Isolation mucoider Stämme von *P. aeruginosa* aus Biofilmen technischer Wassersysteme zeigte aber eine weitere Verbreitung dieses Phänotyps (Grobe et al., 1995).

1.4 Alginate

Das hauptsächlich von *P. aeruginosa* hergestellte Polysaccharid ist ein Polymer, welches aus β -D-Mannuronat und α -L-Guluronat besteht (Abb. 3), welche im Makromolekül in unterschiedlicher Reihenfolge angeordnet sind.

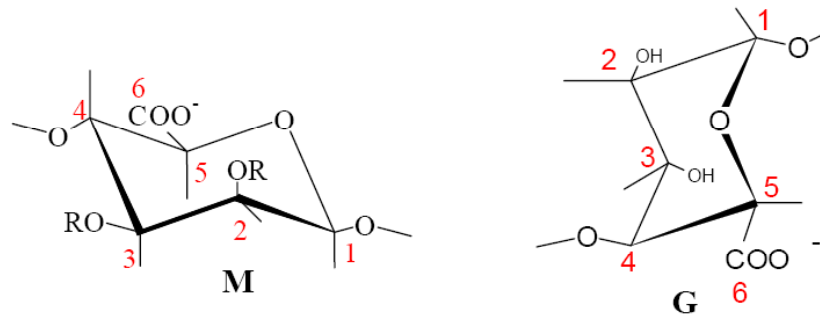


Abb. 3 Monomerbausteine des Alginats: β -D-Mannuronat (M) und α -L-Guluronat (G).

Es können homopolymere Bereiche eines Monomers vorkommen, sowie heteropolymere Bereiche, in denen die Monomere abwechselnd vorliegen (Abb. 4). Die Struktur und Sequenz des bakteriellen Alginats des in dieser Arbeit verwendeten Stamms *P. aeruginosa* SG81 wurde von Schürks et al. (2002) untersucht, es zeigte sich dabei eine von der statistischen Verteilung abweichende Präferenz für MMG Blöcke.

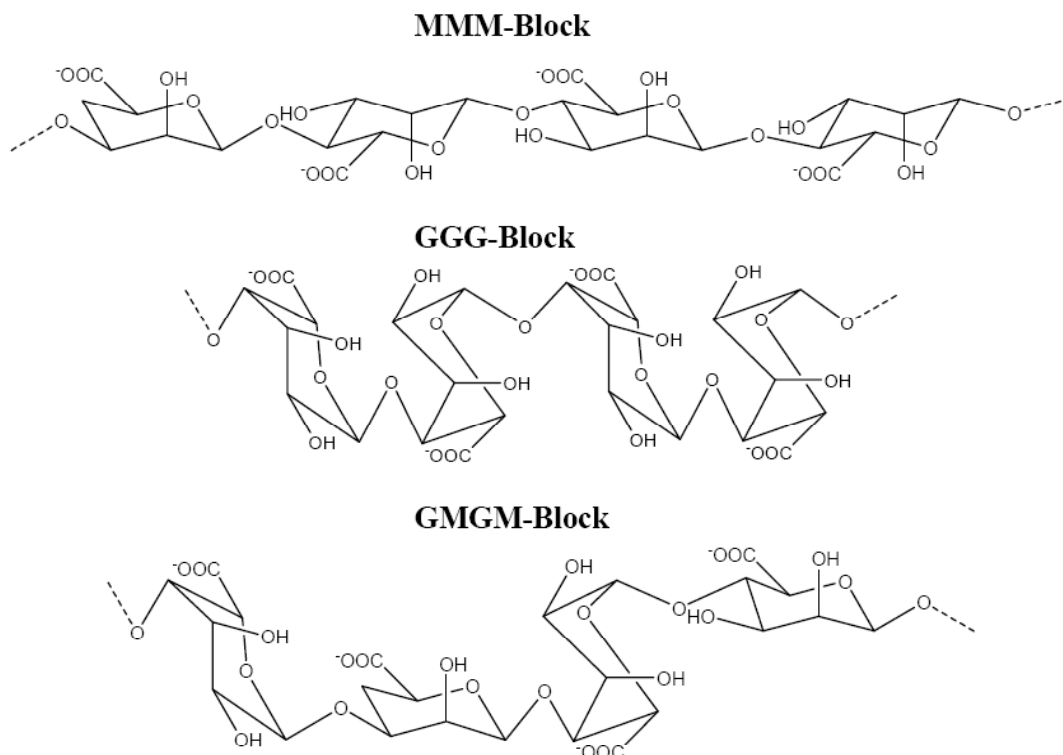


Abb. 4 Beispiele für verschiedene mögliche Strukturen der Alginatblöcke in einem Alginatmakromolekül.

1.5 Zellwandaufbau Gram-negativer Bakterien wie *P. aeruginosa*

Für das Verständnis der Mechanismen des Stoffaustauschs einer Zelle mit der Umwelt ist es notwendig, einen genaueren Blick auf den Aufbau der Zelle zu werfen. Das Bakterieninnere ist von einer zytoplasmatischen (inneren) Membran umgeben, welche hauptsächlich aus einer Phospholipiddoppelschicht und integralen sowie peripheren Proteinen besteht. Zwischen ihr und der äußeren Membran erstreckt sich der periplasmatische Raum. Dort befinden sich neben der Petidoglycanschicht zahlreiche Proteine, darunter auch einige Enzyme. Die äußere Membran ist asymmetrisch aufgebaut und enthält innen eher Phospholipide und Lipoproteine, während außen die Lipopolysaccharide dominieren. Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Membranen eines Gram-negativen Bakteriums:

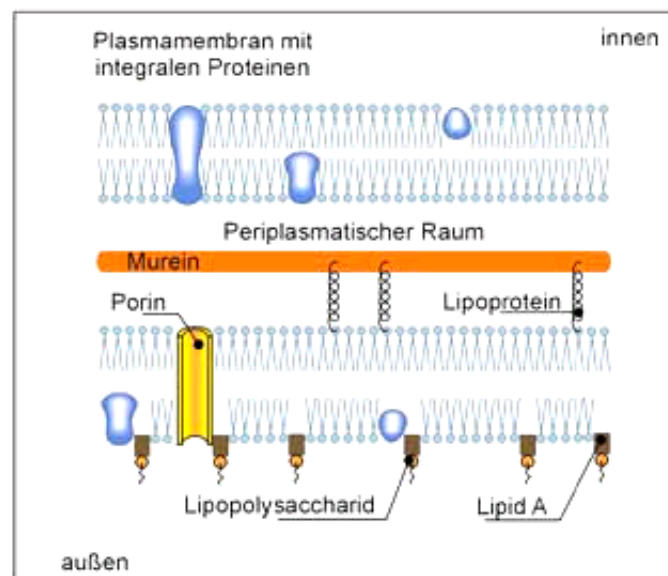


Abb. 5 Schematischer Aufbau der Zellwand eines Gram-negativen Bakteriums

Durch Zell-Lysis können intrazelluläre Proteine in den Biofilm eingetragen werden. Allerdings ist es den Bakterien auch möglich, aktiv Proteine in den extrazellulären Raum zu bringen. Dadurch ist es ihnen möglich, ihre Umgebung aktiv zu verändern.

1.6 Protein-Sekretion

Um Proteine aus der Zelle ausschleusen zu können, müssen die Cytoplasmamembran sowie die äußere Membran überwunden werden. In der Literatur werden dafür sechs verschiedene Typen der Proteinsekretion Gram-negativer Bakterien beschrieben:

Die Typ-I-Sekretion ist eine Ein-Schritt-Sekretion. Dabei wird das Protein direkt mit Hilfe eines ABC-Proteins (ATP-binding-cassette) in der inneren Membran über ein periplasmatisches Membranfusionsprotein durch ein Porenprotein der äußeren Membran sekretiert (Higgins, 1992).

Die Typ-II-Sekretion ist eine Zwei-Schritt-Sekretion. Eine N-terminale Peptidsequenz erlaubt den Durchtritt des Proteins in den periplasmatischen Raum. Dort werden nach der Entfernung dieser Sequenz das Protein gefaltet und eventuelle Disulfidbrücken geknüpft. Der zweite Schritt erfolgt über den Typ-II-Apparat (Sekreton) und befördert das Protein in den extrazellulären Raum (Filloux et al., 1998).

Die Typ-III-Sekretion erfolgt mit Hilfe von etwa 20 Proteinen, meist aus der inneren Membran, die bewirken, dass Proteine in einer Ein-Schritt-Sekretion ausgeschleust werden. Nach Kontakt mit einer eukaryotischen Zelle wird die Proteinsekretion gestartet und erfolgt in der Art, dass dabei auch die Cytoplasmamembran der Wirtszelle penetriert wird und das Bakterium dadurch die Proteine in die Wirtszelle injiziert (Yahr et al., 1996).

Bei der Typ-IV-Sekretion werden Makromoleküle über ein System aus etwa 10 Proteinen aus dem Bakterium meist direkt in ein anderes Bakterium oder eine eukaryotische Zelle transportiert. Dabei bildet ein Teil dieser Proteine eine Art Pore, während ein anderer Teil eine Pilus-ähnliche Struktur bildet und damit den Kontakt zur Wirtszelle vermittelt (Yeo und Waksman, 2004).

Eine Autotransportersekretion kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Bei der Typ-Va-Sekretion erfolgt der Transport über die innere Membran durch den Sec-Mechanismus. Im Periplasma wird das N-terminale Signalpeptid abgespalten. Der C-terminale Teil des entstandenen Intermediats bildet eine Porenstruktur in der äußeren Membran aus, durch den der N-terminale Teil die Membran durchdringt. Dort kann er entweder die eigentliche Funktion des Proteins übernehmen oder durch Proteasen oder Autoprotolyse abgetrennt werden und in den extrazellulären Raum vordringen (Loveless und Saier, 1997).

Die Typ-Vb-Sekretion als zweite Art der Autotransportersekretion wird auch TPS-Sekretion (Two-Partner Secretion) genannt. Dabei wird nach dem Transport über die innere Membran mithilfe des Sec-Mechanismus das ungefaltete Protein an ein Transporterprotein geleitet, welches eine Pore in der äußeren Membran bildet und

die Translokation außerhalb der Zelle gewährleistet. Erst dort wird das Protein gefaltet und verlässt dann die Zelloberfläche (Jacob-Dubuisson et al., 2001).

Die Bildung von Membranvesikeln ist ein unspezifischer Sekretionsmechanismus, welcher in der Vergangenheit häufig unbeachtet blieb, jedoch bei Gram-negativen Bakterien weite Verbreitung zeigt (Schooling und Beveridge, 2006). Es schnüren sich Teile der äußeren Membran ab und umschließen dabei Teile des Periplasmas. Diese Vesikel können dann verschiedene Proteine, darunter auch Enzyme enthalten (Alan et al., 2003; Kadurugamuwa und Beveridge, 1995). Nukleinsäuren konnten ebenfalls in den Vesikeln nachgewiesen werden (Renelli et al., 2004). Es wird dabei spekuliert, ob diese partikulären Biofilmbestandteile aufgrund des Gehalts an lytisch aktiven Enzymen einen aggressiven Charakter besitzen und destruktiv auf andere Zellen wirken (Li et al., 1998). Die Vesikelbildung scheint jedoch auch weitere Vorteile für die Zelle im Biofilm zu bieten, so kann unter anderem in ihnen eine Antibiotikaakkumulation nachgewiesen werden, welche dann nicht mehr gegen die Zelle wirksam werden kann und diese dadurch schützt. Strukturebende Eigenschaften werden ebenfalls im Zusammenhang mit Membranvesikeln und ihrer intrinsischen Oberflächenstruktur vermutet (Schooling und Beveridge, 2006).

1.7 Analyse von Proteinen

Die Analyse von Proteinen kann sowohl qualitativ als auch quantitativ erfolgen. Häufig muss dafür vorher der Proteinanteil der zu analysierenden Probe isoliert werden, da begleitende Inhaltstoffe die Analyse stören können. Dafür werden häufig selektive Fällungsverfahren verwendet, welche die Proteine aus einer Lösung abtrennen. In manchen Fällen kann eine Lösung aber auch ohne vorherige Aufarbeitung untersucht werden.

1.7.1 Quantitative Analyse

Als Summenparameter kann die Konzentration von Proteinen in Lösungen bzw. Suspensionen mit verschiedenen biochemischen Assays quantifiziert werden. Die gängigsten Methoden dafür sind photometrische Testverfahren wie der Farbstoffbindungstest nach Bradford (Bradford, 1976) und die auf die Biuret-Reaktion aufbauenden Assays. Bei ersterer wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G250 durch Komplexierung mit den kationischen und den

nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine im sauren Milieu von 465 nm nach 595 nm verschoben. Dies kann in der untersuchten Probelösung direkt photometrisch detektiert werden.

Bei der Biuret-Reaktion wird Cu^{2+} von zwei Peptidbindungen komplexiert. Dieser bereits gefärbte Komplex kann jetzt weiter behandelt werden, da das Kupfer leicht reduzierbar ist. Häufig wird Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz hinzugefügt um den Assay nach Lowry zu erhalten, welcher dann eine tiefblaue Färbung im Absorptionsbereich von 750 nm erzeugt (Lowry et al., 1951). Die Zugabe von Bicinchoninsäure zur Biuret-Reaktion führt zum BCA-Assay, dessen rosafarbener Komplex ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt (Smith et al., 1985).

Diese quantitativen Methoden ermöglichen eine Bestimmung der Proteinkonzentration dadurch, dass eine Kalibrierung mit einem Referenzprotein (meist BSA) durchgeführt wird. Die lineare Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration der Proteinlösung ermöglicht eine Bestimmung der unbekannten Konzentration. Leider sind die Absorptionskoeffizienten proteinspezifisch und von Protein zu Protein unterschiedlich, weshalb solche Bestimmungen immer kritisch zu betrachten sind.

1.7.2 Spezieller Nachweis von Enzymen mittels Aktivitätsmessungen:

Eine Möglichkeit zur spezifischen Proteindetektion besteht darin, die in einer Lösung vermuteten hydrolytisch wirkenden Enzyme dadurch nachzuweisen, dass man sie auf meist gefärbte oder fluoreszierende Substrate einwirken lässt. Durch die enzymatische Spaltung des Substrats wird der Farbstoff freigesetzt und kann meist photometrisch nachgewiesen werden, oder die Abnahme an Ausgangssubstrat kann nachgewiesen werden. Diese Reaktionen funktionieren aber nur bei aktiven Enzymen. Beispiele hierfür sind die Messung der Proteaseaktivität (Prestidge et al., 1971), der Lipaseaktivität (Winkler und Stuckmann, 1979) oder der Esteraseaktivität (Kok et al., 1993) welche auch in den EPS von *P. aeruginosa* durchgeführt wurden (Tielen, 2005).

Die Bestimmung der Enzymaktivität ist, obwohl sehr spezifisch, für viele Fragestellungen hinreichend, weil weitere Informationen über andere in der Lösung vorhandene Proteine nicht benötigt werden. Denaturierte oder gehemmte (inhibierte) Enzyme können dadurch allerdings nicht nachgewiesen werden.

1.7.3 Protein-Trennung

Da Proteinlösungen fast immer Mischungen verschiedener Einzelkomponenten sind, ist zur qualitativen Proteinanalyse eine Auftrennung der unterschiedlichen Proteine erforderlich. Hierzu können Methoden verwendet werden, welche die Proteine anhand ihrer unterschiedlichen physikalischen Parameter differenzieren. Als Beispiel dafür sind chromatographische Methoden wie die Gelpermeationschromatographie zu nennen.

Eine Methode der qualitativen Analyse, welche auch zur Quantifizierung dienen kann, ist die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemischs in einem Gel aus Polyacrylamid mit anschließender Anfärbung der Proteinbanden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld kann nach Ablauf einer bestimmten Trennzeit und Detektion der entstandenen Banden, mithilfe von mitgelaufenen Referenzproteinen bekannter Größe, auf die Größe der Moleküle geschlossen werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist von den Variablen der elektrischen Feldstärke, der Ladung des Moleküls, der Molekülgröße (hydrodynamischer Radius) sowie der Viskosität der Lösung abhängig. Abb. 6 zeigt das Kräfteverhältnis für ein geladenes gelöstes Teilchen im elektrischen Feld.

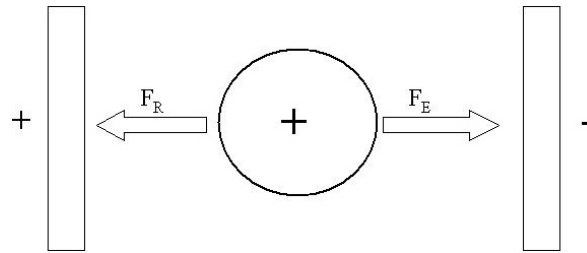


Abb. 6 Kräfteverhältnis eines geladenen Teilchens im elektrischen Feld. Gegen die elektrische Anziehungskraft (F_E) ist die Reibungskraft (F_R) gerichtet.

Es gelten hier die folgenden physikalischen Zusammenhänge und Gleichungen:

$$F_R = 6 \cdot \eta \cdot \pi \cdot r \cdot v$$

F_R = Reibungskraft [N]

η = Viskosität der Lösung [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

r = Stokes-Radius (Radius einschließlich Hydrathülle) [m]

v = Wanderungsgeschwindigkeit [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

$$F_E = E \cdot z \cdot e$$

F_E = Kraft, die im elektrischen Feld auf das geladene Teilchen wirkt

E = elektrische Feldstärke [$\text{N} \cdot \text{C}^{-1}$]

z = Ladungszahl

e = Elementarladung [C]

Für eine konstante Wanderungsgeschwindigkeit kann man diese Gleichungen gleichsetzen und nach der Geschwindigkeit v auflösen.

$$v = \frac{E \cdot z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Durch SDS-Zusatz werden die Proteine durch Mizellbildung nach außen hin mit einer einheitlichen Ladung pro Oberfläche versehen. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit bei konstanter elektrischer Feldstärke und einheitlicher Viskosität der Lösung nur noch von der Molekülgröße abhängig.

1.7.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Da sich bei der elektrophoretischen Trennung häufig mehrere Proteine mit ähnlicher Molekülgröße in einer angefärbten Proteinbande befinden wurde eine Methode entwickelt, welche die Proteintrennung verbessert. Eine Kopplung zweier Verfahren verbessert die Trennungsleistung enorm. Wenn die Proteine vor der elektrophoretischen Trennung anhand ihrer Ladung aufgetrennt wurden, spricht man

von einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-GE), erstmals veröffentlicht von O'Farrell (1975). Dabei wandern die geladenen Proteinmoleküle (wie alle geladenen Teilchen) bei der Anlegung eines elektrischen Feldes. Befindet sich innerhalb des elektrischen Feldes ein pH-Gradient, wandern sie so lange, bis sie ihren isoelektrischen Punkt im Gradienten erreichen, an dem die Nettoladung des Moleküls neutral ist. Da sie nun keine äußere Ladung mehr aufweisen, bewegen sie sich im elektrischen Feld nicht mehr. Diesen, in der Abbildung 3 gezeigten Vorgang, nennt man isoelektrische Fokussierung (IEF).

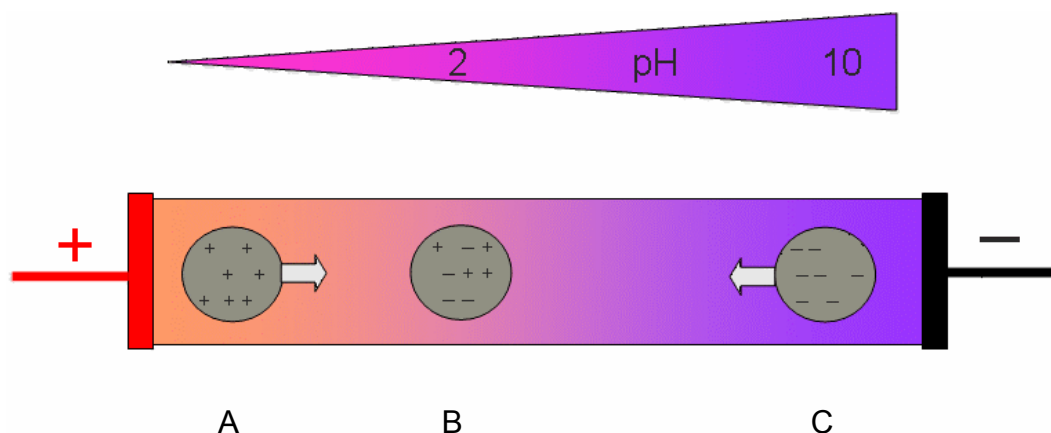


Abb. 7 Schematische Darstellung der isoelektrischen Fokussierung:

Geladene Moleküle (A, C) wandern im pH-Gradienten so lange, bis ihr isoelektrischer Punkt erreicht wurde (B).

Die IEF wird so lange durchgeführt, bis alle Proteine ihren isoelektrischen Punkt erreicht haben. Nahe des isoelektrischen Punktes ist die Ladung eines Moleküls gering, was eine geringe Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge hat. Zur Ermittlung der nötigen Fokussierdauer (in Vh) müssen zeitabhängige Experimente durchgeführt werden, in denen eine Anzahl identischer Proben nach unterschiedlicher Fokussierdauer aus der Fokussieranlage entfernt und weiterbearbeitet werden. Dadurch können dann Richtwerte der Fokussierdauer für spezielle Trennaufgaben ermittelt werden. Eine zu lange dauernde Fokussierung führt zum Phänomen der Überfokussierung, welches horizontale Streifen im gefärbten Gel verursacht. Allerdings können auch weitere Faktoren für ein unvollständiges Trennergebnis verantwortlich sein. So ist bei der Methode der isoelektrischen Fokussierung die Zusammensetzung des IEF-Puffers nicht festgelegt und auf das zu trennende

Gemisch abzustimmen sowie die Vorbehandlung der Proben zu optimieren, damit evtl. störende Stoffe (z. B. zu hohe Salz- oder Polysaccharid-Konzentrationen) eliminiert werden. Auf ein schonendes Fokussierprogramm muss auch geachtet werden, da bei zu schnellem Anstieg der benötigten Spannung (typischerweise bis ca. 10000 V) elektrische Lichtbogenentladungen auftreten können, die den IPG unwiderruflich zerstören.

Seit der Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) ist die Trennleistung und die Reproduzierbarkeit dieser Analysen stark gestiegen (Blomberg et al., 1995). Dafür wird ein Gel auf eine Trägerfolie polymerisiert, welches einen genau definierten pH-Gradienten umspannt. Anhand der Position auf dem Streifen kann somit auf den genauen pH-Wert geschlossen werden.

Dieser fokussierte IPG-Streifen kann nun auf einem konventionellen Polyacrylamidgel fixiert werden und die darin enthaltenen, nach ihrer Ladung aufgetrennten Proteine können dann durch Anlegen eines elektrischen Feldes einer elektrophoretischen Trennung unterzogen werden. Dazu muss er jedoch vorher umgepuffert werden, damit die Proteine jetzt wieder von SDS umgeben sind und dadurch ihre Wanderungsgeschwindigkeit nur noch von ihrer Größe abhängt.

Somit erfolgt eine Trennung der Proteine in zwei Schritten anhand von zwei Parametern. Auf dem fertigen (rechteckigen) Gel, welches eine 2-dimensionale Fläche darstellt, sind die Proteine dann wie folgt getrennt: Entlang der x-Achse nach ihrem isoelektrischen Punkt und entlang der y-Achse anhand ihrer Größe. Ihren (x/y) Koordinaten nach kann man den getrennten Proteinen später diese Variablen zuordnen.

1.7.3.2 Färbung

Damit das 2-dimensionale Trennergebnis erfasst und dokumentiert werden kann, ist eine Anfärbung der (farblosen) Proteine notwendig. Dafür existieren in der Literatur viele verschiedene Verfahren, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Drei dieser Verfahrensarten werden nun näher beschrieben; sie unterscheiden sich in Sensitivität und apparativem Aufwand. Zu erwähnen ist, dass zu jeder Methode eine Vielzahl von unterschiedlichen Protokollen mit unterschiedlichen Rezepturen und Empfindlichkeiten zur Anwendung existiert.

1.7.3.2.1 Coomassie-Färbung:

Das Prinzip dieser Färbung beruht auf der Farbstoffbindung von Coomassie Brillantblau. Die Proteine werden in der von Fazekas de St. Groth et al. (1963) entwickelten Methode meist mit Essigsäure/Methanol-Gemischen im Gel fixiert und dann mit einem der beiden Farbstoffe Coomassie Brillantblau R 250 oder Coomassie Brillantblau G 250 gefärbt und der Hintergrund nachher wieder entfärbt. Die Färbungen sind einfach durchzuführen, allerdings auch recht unempfindlich. Bei der Detektion wird die Absorption des Lichts gemessen, welches durch die gefärbten Bereiche des Gels fällt, welche durch die Komplexbindung des Farbstoffs mit dem Protein (siehe quantitative Analyse der Proteine) gebildet wurden. Die Färbung ist linear konzentrationsabhängig und erlaubt dadurch auch eine Quantifizierung der Proteinspots, die Nachweisgrenze ist jedoch recht hoch (etwa 20 ng / Spot).

1.7.3.2.2 Silber-Färbung:

In der erstmals von Merrill et al. (1979) veröffentlichten Methode werden auch hier die Proteine meist mit Essigsäure/Methanol-Gemischen im Gel fixiert. Dann werden die Gele in verschiedenen Reaktions- und Wasch-Schritten behandelt. Meist werden die proteinhaltigen Gele zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweises zuerst mit Natriumthiosulfatlösung imprägniert. Silbernitratlösung sorgt dann für eine Bildung von Silber-Proteinaddukten, hauptsächlich mit den schwefelhaltigen Aminosäuregruppen des Proteins. Spülen entfernt die meisten freien Silberionen, lediglich die am Protein gebundenen verbleiben hauptsächlich im Gel. Durch chemische Reduktion werden diese dann ähnlich dem photographischen Prozess zu metallischem Silber reduziert. Diese Reaktion wird abgebrochen und dann die überschüssigen Silberionen aus dem Gel entfernt. Auf diese Weise entsteht eine hochsensitive Färbung, welche jedoch zur Reproduzierung ein hohes Maß an Sorgfalt sowie hochreine Chemikalien und Geräte erfordert. Geringste Verunreinigungen erzeugen bei dieser Methode eine starke Färbung. Die Sensitivität ergibt sich aus der Lichtundurchlässigkeit des gebildeten metallischen Silbers, welches selbst geringste Spuren Protein (unter 1 ng / Spot) detektiert. Aufgrund dieser Lichtundurchlässigkeit kann eine Quantifizierung der Probe mit dieser Färbung nur näherungsweise erfolgen.

1.7.3.2.3 Fluoreszenz-Färbung:

Seit Entwicklung der von Bermudez et al. (1994) erstmals veröffentlichten Methode der Proteinfärbung mit Nil-Rot sind viele weitere Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt und vermarktet worden. Das Prinzip der Detektion basiert auf dem Phänomen der Fluoreszenz. Dabei wird von einem Molekül bei Lichteinstrahlung eine Lichtemission angeregt, welche detektiert werden kann. Die Emission hat eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht, was die Unterscheidung vom eingestrahnten Licht ermöglicht. Auf dem Markt befindliche kommerzielle Färbelösungen enthalten meist ein Gemisch aus Fixierungshilfsstoffen sowie dem proteinsensitiven Fluoreszenzfarbstoff. Dabei wird das Gel in die gebrauchsfertige Lösung gegeben, um dann nach einem Waschschrift z. B. auf dem Fluoreszenz-Scanner dokumentiert werden zu können. Die Nachweisgrenze dieser fluoreszenzgefärbten Proteine ist sehr gering, die Kosten allerdings sowohl für den Fluoreszenz-Scanner als auch für die Färbelösung sehr hoch. Die Sensitivität ergibt sich einerseits durch eine hohe Lichtausbeute der fluoreszierenden Proteinfarbstoffkomplexe. Auf der anderen Seite verändert sich die Wellenlänge des Emissionsmaximums des Farbstoffs durch Bindung an das Proteinmolekül. Dies erzeugt eine geringe Hintergrundfluoreszenz, da durch die Verwendung von Filtern nur ein geringer Wellenlängenbereich detektiert wird. Eine Verwendung von Lasern zur Anregung der Lichtemission ermöglicht ein noch besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Eine Quantifizierung des Proteins ist mit der Fluoreszenzfärbung gut möglich, da die Lichtemission in einem weiten Bereich linear zur komplexgebundenen Proteinmenge verläuft. Die Sensitivität ist dabei fast so gut wie die der Silberfärbung und kann je nach Sorte des verwendeten Farbstoffs bei etwa 1 ng/Spot liegen.

Die Probenzusammensetzung sowie die Fragestellung entscheiden letztendlich, für welche Färbetechnik man sich entscheidet.

1.7.4 Proteomics

Die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer (meist aus einer Zellkultur gewonnenen) Probe enthalten sind, wird als das Proteom bezeichnet. Es lässt sich mit Hilfe der Techniken der 2D-GE auftrennen und darstellen. Dieser Begriff, der seit 1996 von Mark Wilkins und Keith Williams geprägt wurde, setzt sich aus den beiden Begriffen „PROTEin“ und „GenOMe“ zusammen (Wilkins et al.,

1996). Es wurden Zellaufschlüsse auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht. Dabei konnten Unterschiede bei genetisch identischen Zellen festgestellt werden. Mittlerweile wird ein ganzer wissenschaftlicher Zweig, der sich mit der Untersuchung von Proteinzusammensetzungen beschäftigt, als Proteomics bezeichnet.

Während das Genom nur relativ geringen Veränderungen im Leben einer Zelle unterworfen ist, ist das Proteom sehr dynamisch und zeigt zum Beispiel bei verändernden Umwelteinflüssen starke Schwankungen (Tyers und Mann, 2003).

Über das Genom ist festgelegt, welche Proteine ein Organismus in der Lage ist zu synthetisieren. Die Proteinbiosynthese erfolgt durch Ablesung einzelner Gene. Die Nukleotidsequenz des Gens legt dabei die Aminosäuresequenz fest, welche synthetisiert wird. Die Ablesung der Gene jedoch ist ein Prozess, der durch verschiedenste Einflüsse geregelt wird. Jeder Organismus ändert unter anderem auf Umwelteinflüsse die Ablesung einzelner Gene und damit die Zahl und Art der Proteine, die von ihm synthetisiert werden. Je nach Art der Umwelteinflüsse kann die Änderung im Proteom sehr stark sein. So wurde bei der Ganzzell-Analyse von *P. aeruginosa* ein enormer Unterschied zwischen planktonischen und Biofilm-Zellen entdeckt (Sauer et al., 2002).

Die Sequenzierung eines Genoms stellt praktisch die Offenlegung der Baupläne dar, welche die Zelle besitzt, um Proteine zu synthetisieren. Allerdings ist dadurch nicht geklärt, welche Bereiche des Genoms denn tatsächlich abgelesen werden (Transkription). Die möglichen Aminosäuresequenzen sind im Genom dadurch festgelegt, dass am Anfang und Ende eines Bereiches, der für die Synthese eines Proteins kodiert, eine bestimmte Nukleotidsequenz festgelegt ist. Dieser DNA-Abschnitt wird „open reading frame“ bzw. offener Leserahmen genannt.

Wenn man die Methode der 2D-GE mit der Massenspektrometrie koppelt, können die so aufgetrennten Proteine identifiziert werden (Aebersold und Mann, 2003). Dazu werden aus dem Gel einzelne Bereiche (Proteinspots) herausgeschnitten und die Proteine daraus eluiert und analysiert. Sie werden dabei nur in sehr seltenen Fällen intakt massenspektrometrisch analysiert. Meist werden sie mit Trypsin behandelt, einem Enzym, das proteolytisch an spezifischen Sequenzstellen das Protein teilt. Es entsteht dann im Massenspektrum eine Ansammlung verschiedener Peptide, ein sogenannter Peptid-Fingerprint, der für jedes Protein charakteristisch ist. Von isolierten Proteinen mit analysierter Aminosäuresequenz können einerseits

Peptidfingerprints durch physikalisch-chemische massenspektrometrische Analyse gewonnen werden. Andererseits ist es möglich ein theoretisches Massenspektrum zu erzeugen, da das Enzym Trypsin nur an spezifischen Sequenzstellen schneidet. Ab einem gewissen Übereinstimmungsgrad des gemessenen Spektrums mit der Spektrendatenbank gilt eine Probe als identifiziert (Perkins et al., 1999).

Anhand der Gensequenz und der damit vorgegebenen Aminosäuresequenz können auch theoretische Massenspektren und Fingerprints von hypothetischen, noch nicht isolierten Proteinen erstellt werden. Diese wurden nur im Genom anhand der offenen Leserahmen hypothetisiert.

Anhand von Homologien in der Aminosäuresequenz zu bekannten, isolierten und sequenzierten Proteinen kann dann auf die Funktion des Proteins geschlossen werden.

Die Grenzen der Proteomanalyse sind methodisch bedingt. Einerseits sind bei Proben mit einer stark heterogenen Proteinkonzentration solche Proteine, die nur in geringer Konzentration auftreten, schlecht zu detektieren. Es gibt Versuchsansätze, dominierende Proteine (z. B. Albumin) aus der Probelösung durch Affinitätschromatographie zu entfernen (Lee und Lee, 2004). Auf der anderen Seite gibt es eine Reihe von Stoffen, die mit der IEF inkompatibel sind. Polymere Substanzen können die Poren des Gels verstopfen und eine Fokussierung unmöglich machen. Diese Stoffe müssen vor einer Analyse entfernt werden. Geladene Teilchen in der Probelösung stören die IEF ebenfalls, da sie sich wie die zu analysierenden Proteine im elektrischen Feld bewegen. Viele Proteine sind außerdem sehr hydrophob. Eine Solubilisierung kann durch Veränderung der Zusammensetzung des Probenpuffers ermöglicht werden, indem z. B. eine höhere Detergenzkonzentration gewählt wird.

Die Probenvorbereitung ist der entscheidende Schritt in der Proteomanalytik. Es muss ein Weg gefunden werden, eine Probelösung zu erhalten, welche eine möglichst geringe Konzentration an Störstoffen enthält.

Dabei muss gewährleistet sein, dass die Vorbehandlung die Proteine möglichst nicht in ihrer Art und Konzentration verändert. Des Weiteren sollten proteolytische Enzymaktivitäten unterdrückt werden, da diese das Proteom verändern. Schließlich soll die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch eine möglichst geringe Anzahl an Aufarbeitungsschritten verbessert werden.

Diese Voraussetzungen sind bis jetzt bei der Analyse extrazellulärer Proteine mucoider Stämme von *P. aeruginosa* nicht erfüllt worden, daher konnte das extrazelluläre Proteom bis jetzt nicht untersucht werden.

1.8 Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung des extrazellulären Proteoms des mucoiden Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm. Sie umfasst die folgenden Teilaspekte:

- Isolierung der extrazellulären Proteine aus den EPS mucoider *Pseudomonas aeruginosa* Biofilme
- Analyse der Proteine (Proteinmuster und Identifikation)
- Interpretation der gefundenen Proteine

2 Material

2.1 Bakterienstämme:

Pseudomonas aeruginosa SG81

Dieser mucoide Bakterienstamm wurde ursprünglich aus dem Abfluss der Hausinstallation eines fleischverarbeitenden Betriebs aus Duisburg isoliert (Grobe et al., 1995). Zur Stammhaltung wurden die Bakterien auf PIA über Nacht bei 30 °C oder 36 °C angezüchtet und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Diese Stammplatten werden alle 4 Wochen neu überimpft.

Klebsiella aerogenes Typ 25

Dieses Bakterium wurde auf NBA-Agar kultiviert. Einzelkolonieausstriche wurden für 24 h bei 36 °C bebrütet und dann für bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

2.2 Nährmedien:

Pseudomonas-Isolierungs-Agar (PIA) (Difco) bestehend aus

20 g Bacto-Pepton

1,4 g $MgCl_2$

10 g K_2SO_4

0,025 Irgasan DP300

13,6 g Bacto-Agar

20 ml Glycerin

980 ml A. deion.

Es wurden 45 g des Fertiggranulats mit 20 ml Glycerin versetzt und mit 980 ml A. deion. bei 98 °C unter Rühren gelöst und dann autoklaviert.

Pseudomonas-Isolierungs-Agar (PIA) mit 0,1 M $CaCl_2$ (Ca-PIA)

45 g des PIA Fertiggranulates (Difco) wurden mit 20 ml Glycerin (Merck) versetzt und in 880 ml A. deion. gelöst. 14,7 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$ (Merck) wurden in 100 ml A. deion. gelöst. Beide Komponenten wurden getrennt voneinander autoklaviert und nach Abkühlung auf 50 °C zusammengegeben.

NBA-Agar

8 g Nährbouillon (Difco), 5 g NaCl, 15 g Bacto-Agar (Difco) und 10 g Natriumalginat (Manucol LB) wurden auf 1 l mit A. deion. aufgefüllt und autoklaviert. Der pH-Wert des Agarnährmediums betrug 7,0.

NBA-Bouillon

8 g Nährbouillon (Difco), 5 g NaCl und 10 g Natriumalginat (Manucol LB) wurden auf 1 l mit A. deion. aufgefüllt und autoklaviert. Der pH-Wert des Nährmediums betrug 7,0.

Alle Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 2 MPa autoklaviert. Die heiße Lösung wurde danach zu je 25 ml in Petrischalen gegeben. Die fertigen Agarplatten wurden im Kühlschrank für maximal vier Wochen gelagert. Für Agarplatten, die zur Anzucht von konfluenten Bakterienrasen genutzt wurden, wurden Petrischalen mit Nocken im Deckel verwendet, um eine optimale Belüftung der Kultur während der Bebrütung zu gewährleisten.

2.3 Chemikalien:

Amidosulfonsäure, Fa. Sigma, Art. Nr. S-6771

Ammoniumhydrogencarbonat, Fa. Fluka, Art. Nr. 40867

Ammoniumpersulfat, Fa. Serva, Art. Nr. 13375

Ammoniumsulfat, Fa. Riedel-de Haën, Art. Nr. 11225

Benzonase, Reinheitsgrad 1 (*Serratia marcescens*), Fa. Merck, Art. Nr. 101694

Bio-Lyte Ampholyte (pH 3-10), Fa. Bio-Rad, Art. Nr. 163-1112

CHAPS, Fa. Sigma, Art. Nr. C-9426

DTT (1,4 Dithio-DL-threitol), Fa. Fluka, Art. Nr. 43815

Essigsäure (99-100 %), Fa. J. T. Baker, Art. Nr. 6052

Glycerin wasserfrei, p. a., Fa. Fluka, Art. Nr. 77610

Harnstoff, Fa. Fluka, Art. Nr. 51456

3-Hydroxybiphenyl, 90%, Fa. Sigma, Art. Nr. H-6527

Iodacetamid, Fa. Sigma, Art. Nr. I6125

Kaliumhydroxid, Fa. Baker, Art. Nr. 0385

Methanol, p.a., Fa. Riedel-de Haën, Art. Nr. 32213

Natriumdodecylsulfat Merck, Art. Nr. 1.13760.1000

Natriumtetraborat-decahydrat, p. a., Fa. Fluka, Art. Nr. 72000
Natriumchlorid, Fa. Fluka, Art. Nr. 71381
Natriumcarbonat, Fa. Riedel-de Haën 31432
Natriumhydroxid, Fa. Baker, Art. Nr. 0402
Natriumthiosulfat, Fa. Merck, Art. Nr. 1.06516
Phenol, Fa. Fluka, Art. Nr. 77610
Proteinase K (*Tritirachium album*), Fa. Sigma, Art. Nr. P-6556
Rinderserumalbumin, Fraktion V. min 96%, Fa. Sigma, Art. Nr. A-4503
Salzsäure, Fa. Baker, Art. Nr. 6167
Serva Blue R, Fa. Serva, Art. Nr. 35051
Schwefelsäure (95-97 %), Fa. Riedel de Haën, Art. Nr. 30743
Silbernitrat, Fa. Merck, Art. Nr. 101512.0025
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Fa. Serva, Art. Nr. 35925
Thioharstoff, Fa. Riedel-de Haën, Art. Nr. 16217
Tributylphosphin, Fa. Fluka, Art. Nr. 90827
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. Merck, Art. Nr. 8382
Trypsin, Fa. Promega, Art. Nr. V511A
Wasser, Ultrapur, Fa. Merck, Art. Nr. 1.01262.100

2.4 Kommerzielle Chemikalien-Mixturen und Kits:

- SilverXpress Silver Staining Kit (LC6100) Fa. Invitrogen

Sensibilisierungsreagenz:	enthält Glutaraldehyd
Färbelösung A:	enthält Silbernitrat
Färbelösung B:	enthält Ammoniumhydroxid
Entwickler:	enthält Formaldehyd und Zitronensäure
Stopper:	enthält Zitronensäure

- SimplyBlue™ SafeStain (LC6060) Fa. Invitrogen

Färbelösung:	enthält Coomassie G-250
--------------	-------------------------

Fertig-Gele:

- 12% Tris Glycin (Invitrogen, EC60052BOX)
- 4 – 16 % Zymogram Casein-Blue Gel (Invitrogen, EC64152BOX)
- 10 % Zymogram Gelatin Gel (Invitrogen, EC61752BOX)

Tis/Glycin/SDS Laufpufferkonzentrat (10x) Fa. Bio-Rad, Art. Nr. 161-0732

Elektrophoresepuffer (Tris/Glycin) Fa. Invitrogen, Art. Nr. LC2675

IPG-Streifen:

ReadyStrip 17 cm, pH 3-10 Fa. Bio-Rad, Art. Nr. 163-2007

ReadyStrip 17 cm, pH 4-7 Fa. Bio-Rad, Art. Nr. 163-2008

ReadyStrip 17 cm, pH 7-10 Fa. Bio-Rad, Art. Nr. 163-2012

Lowry-Reagenzien:

Lowry Reagenz, modifiziert, Fa. Sigma, Art. Nr. L-1013

Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz, Fa. Sigma, Art. Nr. F-9252

Kalibrations-Mix für die Massenspektrometrie:

des-Arg-Bradykinin ($[M+H]^+$ = 904,47 g/mol)

Angiotensin I ($[M+H]^+$ = 1296,69 g/mol)

Glu-Fibrinopeptid b ($[M+H]^+$ = 1570,68 g/mol)

Neurotensin ($[M+H]^+$ = 1672,92 g/mol)

ACTH-Clip 1-17 ($[M+H]^+$ = 2093,09 g/mol)

ACTH-Clip 18-39 ($[M+H]^+$ = 2465,20 g/mol)

ACTH-Clip 7-38 ($[M+H]^+$ = 3657,93 g/mol)

2.5 Geräte:

UV-VIS-Spektrometer	Fa. Shimadzu, UV1202
Schüttelmaschine	Fa. Scientific Industries, Vortex Genie 2
Kühlzentrifuge	Fa. Sorvall, RC 26 Plus, Rotor SS-34
Densitometer	Fa. Bio-Rad, GS-710
Gefriertrocknungsanlage	Fa. Christ, Typ Alpha 1-2
Schütteltisch	Fa. Biometra, Rocking-Plattform WT15
Elektrophoresekommer (1D)	Fa. Biometra, Apparatur Typ G42 für Minigele und Power Supply Fa. Biometra, Typ Power Pack P25
Elektrophoresekommer (2D)	Fa. Bio-Rad, Protean II xi mit Bio-Rad PowerPac 1000 Power supply
IEF-Apparatur	Fa. Bio-Rad, Protean IEF-cell

Kapillar-Viskosimeter	Fa. Schott, Mikro-KPG-Ubbelohde-Viskosimeter, Kapillare I, Typ 53610
Massenspektrometer	Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer (Foster City, USA), Ionisations-Laser: Nd-YAG 3' mit 355 nm Wellenlänge
Ultraschall-Desintegrator	Fa. Branson, Typ Sonifier 250

2.6 Computer-Software und Datenbanken:

Quantity One V. 4.1.0 (Bio-Rad)

PD-Quest V. 6.2.0 (Bio-Rad)

GPS Explorer Workstation (Applied Biosystems)

National Center for Biotechnological Information Homepage:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Pseudomonas Homepage: (<http://www.pseudomonas.com>)

Berechnung der theoretischen MW und pI anhand der Aminosäuresequenz:

(http://expasy.org/tools/pi_tool.html)

Vorhersage der zellulären Lokalisation von Proteinen *P. aeruginosa*:

(<http://www.cbs.dtu.dk>)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht von Biofilmen von *P. aeruginosa*

Von einer Stammplatte wurde eine Einzelkolonie von *P. aeruginosa* SG81 auf einer PIA-Platte als Einzelkolonieausstrich ausgestrichen und die Platte 24 h bei 36 °C bebrütet (Vorkultur). Von dieser Vorkultur wurden mehrere Einzelkolonien mit einer Impföse entnommen und in 5 ml einer sterilen 0,14 mol/l NaCl-Lösung homogen suspendiert. Es wurde soviel Bakterienmaterial verwendet, bis eine Trübung entstand, die dem McFarland-Standard 2 entsprach (etwa 6×10^8 Zellen pro ml). Je 0,1 ml dieser Suspension wurden auf Agar-Medium (PIA oder Ca-PIA) ausplattiert und die Platten wurden bei 36 °C für 24 h bis zu 72 h bebrütet. Während dieser Bebrütungsdauer entwickelte sich ein konfluenten schleimiger Bakterienrasen (Biofilm) auf der Agaroberfläche.

3.1.2 Gewinnung der EPS

Der Biofilm wurde mit einem Metallspatel vorsichtig von der Oberfläche des Agar-Nährmediums abgeschabt, mit der 15-fachen Masse einer sterilen 0,14 mol/l NaCl-Lösung versetzt und die Suspension wurde für 30 min auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Bei der Verwendung von auf Ca-PIA gewachsenen Biofilmen wurde 1 mM EDTA zur 0,14 M NaCl-Lösung gegeben. Die Suspension wurde dann für 2 h bei 40000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Membranfilter aus Celluloseacetat der Porenweite 0,2 µm (Fa. Sartorius, Minisart) filtriert.

Die zellfreie Lösung wurde mit 1 mg/ml Pefabloc® SC-Protease Inhibitor (Roth) und 3 mg/ml L-Arginin versetzt und für 30 min auf dem Magnetrührer gerührt.

3.1.2.1 Aufarbeitung für die isoelektrische Fokussierung

Es erfolgte eine Dialyse der nach 3.1.2 gewonnenen Lösung gegen 5 l A. deion. bei 4 °C mit einem zuvor ausgekochten Dialyseschlauch der Ausschlussgröße 12000 bis 14000 g/mol (regenerierte Cellulose, Porenweite 2,5 nm, Fa. Serva, Visking dialysis

tubing). Die Vorlage wurde zweimal nach je 1 h gewechselt. Eine weitere Dialyse gegen 5 l A. deion. wurde bei 4 °C übernacht durchgeführt.

Nach der Dialyse wurde jeweils 40-50 ml der Lösung in eine gerührte Ultrafiltrations-Zelle (Modell Amicon 8050, Millipore) gegeben, welche mit einer Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose, Typ Ultracel YM-100, Durchmesser 44,5 mm, Ausschlußgrenze 100000 Da, Fa Millipore bestückt war. Mit Stickstoffüberdruck von 4.5 bar erfolgte unter Rühren die Abtrennung einer dünnflüssigen Fraktion, die am Ablauf der Zelle aufgefangen wurde. Die Filtration wurde so lange durchgeführt, bis das Volumen der Lösung in der Zelle auf ca. 1/5 der Ausgangsmenge vermindert war. Dabei erreichte die Flüssigkeit in der Zelle eine hohe Viskosität, die den Ablauf fast versiegen ließ. Dann wurde der restliche Inhalt verworfen und die Membran drucklos mit A. deion. durch Rühren mehrfach gereinigt und die Filtration mit frischer Lösung fortgesetzt. Die vereinigten Filtrate wurden gefriergetrocknet.

Es entstand ein schwach rosafarbenes Lyophilisat von feinkristalliner bis watteartiger Konsistenz. Es wurde in einem dicht verschlossenen Gefäß bei -20 °C für bis zu einem Monat gelagert.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Polysaccharidkonzentration

3.2.1.1 Bestimmung der Gesamtkohlenhydratkonzentration (Dubois et al., 1956)

Reagenzien:

- Konzentrierte Schwefelsäure
- Phenol-Lösung, 5 % (w/v):

5 g Phenol wurden in 100 ml A. deion. gelöst.

- Standard:

Gereinigtes Bakterienalginat, 200 µg/ml in A. deion.

Durchführung:

Zu 0,5 ml Probenlösung wurden 0,5 ml Phenol-Lösung und 2,5 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben und die Lösung auf dem Vortex durchmischt. Es war darauf

zu achten, dass Phenol-Lösung und Schwefelsäure möglichst schnell hintereinander zugegeben wurden. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 15 min in ein 30 °C warmes Wasserbad gestellt. Nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbad wurde nach 5 min bei Raumtemperatur die Absorption der Ansätze bei 480 nm gegen A. deion. gemessen. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung.

3.2.1.2 Bestimmung der Uronsäurekonzentration (Filisetti-Cozzi und Carpita, 1991)

Reagenzien:

- Sulfamat-Lösung, 4 mol/l :

19,42 g Amidosulfonsäure wurden in 20 ml A. deion. gegeben und bis zur Lösung tropfenweise mit gesättigter Kaliumhydroxid-Lösung versetzt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der pH-Wert mit Kaliumhydroxid-Lösung auf 1,6 eingestellt und der Ansatz mit A. deion. auf 50 ml aufgefüllt.

- Schwefelsäure-Tetraborat-Lösung:

5,7206 g Natriumtetraborat-decahydrat wurden in 200 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst.

- Natriumhydroxid-Lösung 0,5% (w/v):

0,5 g Natriumhydroxid wurden in 100 ml A. deion. gelöst.

- 3-Hydroxybiphenyl-Lösung 0,15% (w/v):

15 mg 3-Hydroxybiphenyl wurden in 10 ml 0,5 % Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Diese Lösung wurde unter Lichtausschluss bis zu einer Woche im Kühlschrank gelagert.

- Standard:

Gereinigtes Bakterienalginat 200 µg/ml in A. deion.

Durchführung:

0,4 ml Probenlösung wurden mit 40 µl Sulfamat-Lösung auf einem Reagenzglasschüttler durchmischt. Danach wurden 2,4 ml Schwefelsäure-Tetraborat-Lösung zugesetzt und auf dem Vortex erneut gut durchgemischt. Anschließend wurden die Proben für 20 min in ein 100 °C heißes Wasserbad gestellt und danach für 5 min im Eisbad abgekühlt. Es wurden 80 µl der 3-Hydroxybiphenyl-Lösung hinzugegeben und die Ansätze wiederum auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Ansätze bei 525 nm gegen A. deion. gemessen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der Alginatlyase-Aktivität. (nach Lange et al., 1988)

Zur Bestimmung der Alginatlyase-Aktivität wurde enzymhaltige Lösung zu einer definierten Alginatlösung gegeben und bei 37 °C inkubiert. Die entstehenden reduzierenden Zuckerenden des Alginats wurden mit dem TBA-Assay (nach Weissbach et al., 1959) nachgewiesen.

Reagenzien:

- TBA-Lösung

0,3g 2-Thiobarbitursäure wurden in 100 ml A.deion. gelöst.

- Arsenitlösung

2 g NaAsO₂ wurden in 0,5 M HCl gelöst.

- Perjodsäurelösung

0,2845g H₅IO₆ wurden in 50 ml 0,0625 M H₂SO₄ gelöst.

- Substratlösung a

660 mg Alginat (Manucol LHF) wurden mit 1750 mg NaCl in 100 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7, gelöst.

- Substratlösung b

660 mg gereinigtes Bakterienalginate wurden mit 1750 mg NaCl in 100 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7, gelöst.

- Substratlösung c

EPS-Lösung wurde nach 3.1.2. gewonnen, jedoch ohne dass L-Arginin oder Pefabloc hinzugesetzt wurde.

Durchführung:

0,5 ml Substratlösung (a, b oder c) wurden mit 0,1 ml enzymhaltiger Lösung vermischt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Inkubationsdauer wurde variiert, um den enzymatischen Abbau zu optimieren. Durch 2 min Erhitzen auf 98 °C im Wasserbad wurde die Reaktion gestoppt.

0,2 ml dieser Lösung wurden mit 0,25 ml Perjodsäurelösung versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Arsenitlösung und nach weiteren 2 min 2 ml TBA-Lösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde kurz auf dem Vortex geschüttelt und dann für 10 min bei 98 °C im Wasserbad erhitzt. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Absorption bei 548 nm gegen A. deion. gemessen. Eine Enzymeinheit (U) wurde definiert als die Enzymaktivität, die unter den beschriebenen Testbedingungen 1 nmol β -Formylpyruvat pro min freisetzt. 10 nm β -Formylpyruvat entsprechen dabei einer E_{548} von 0,29 (Preiss und Ashwell 1962)

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (modifiziert nach Lowry et al., 1951)

Es wurden kommerzielle Reagenzien der Firma Sigma verwendet. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Methode nach Lowry mit einem Arbeitsbereich von ≤ 60 $\mu\text{g/ml}$ BSA (Balters, 2000).

Reagenzien:

- Lowry-Reagenz (Sigma L 1013):

In eine Flasche modifiziertes Lowry-Reagenz wurden 40 ml A. deion. gegeben und bis zur vollständigen Lösung geschüttelt.

- Phenolreagenz (Sigma F 9252):

Zu 22,5 ml A. deion. wurden 4,5 ml Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz gegeben und die Lösung wurde gut durchmischt. Diese Lösung war lichtempfindlich und nur einen Tag lagerfähig.

- Standard:

BSA-Lösung, 100 µg/ml in A. deion.

Durchführung:

0,5 ml Probenlösung wurden mit 0,5 ml Lowry-Reagenz gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,25 ml Phenolreagenz hinzugegeben und die Ansätze auf dem Vortex durchmischt. Nach 30 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm gegen A. deion. bestimmt, wobei immer der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung berechnet wurde.

3.3 Gelelektrophoretische Methoden

3.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Reagenzien:

- SDS-Probenpuffer (Invitrogen, LC2676)

enthält Tris, Glycerin, SDS und Bromphenolblau (pH 6,8)

- Elektrophoresepuffer (Invitrogen, LC2675)

enthält Tris, Glycin und SDS (pH 8,3)

Dieses Pufferkonzentrat wurde kurz vor Gebrauch 1:10 mit A. deion. verdünnt.

- Reduzierungs-Reagenz (Invitrogen, NP0004)

enthält Dithiothreitol

- Fertiggele 12 % Tris Glycin (Invitrogen, EC60052BOX)

Dicke: 1,0 mm;

- Markerproteine (Mark 12, Wide Range Protein Standard; Invitrogen, LC5677)

Myosin	200,0 kDa
β-Galactosidase	116,2 kDa
Phosphorylase B	97,4 kDa
Serumalbumin	66,3 kDa
Glutamat-Dehydrogenase	55,4 kDa
Lactat-Dehydrogenase	36,5 kDa
Carboanhydrase	31,0 kDa
Trypsin-Inhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,5 kDa
Aprotinin	6,0 kDa
Insulin, B-Kette	3,5 kDa
Insulin, A-Kette	2,5 kDa

Durchführung:

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem, wie von Laemmli (1970) beschrieben. Fertiggele (SDS-Polyacrylamidgele) und Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Es wurden 45 µl Probelösung mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer vermischt. Nach Zugabe von 10 µl Reduzierungs-Reagenz wurden die Ansätze nochmals gemischt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 85 °C inkubiert. Von diesen denaturierten Proben wurden jeweils 12,5 µl bzw. 25 µl auf das Gel aufgetragen. Der gelelektrophoretische Lauf erfolgte in einer vertikalen Gelapparatur (Biometra, Typ G42 für Minigele) für etwa 1,5 h unter konstanter Spannung von 125 V. Nach der Elektrophorese wurden die Fertiggele mit dem Färbekit „SilverXpress Silver Staining Kit“ angefärbt.

3.3.1.1 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Fertiggelen

Die Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach der Elektrophorese mit dem kommerziellen Färbe-Kit „SilverXpress Silver Staining Kit“ (LC6100) der Fa. Invitrogen nach Herstellerangaben. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Densitometer (Bio-Rad, Typ GS-710) eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Quantity One“ der Firma Bio-Rad.

3.3.2 Gelelektrophorese zur Bestimmung von Protease-Aktivitäten

Zum Nachweis von Protease-Aktivitäten wurden kommerziell erhältliche Casein-Blue-Zymogramme sowie Gelatine-Gele der Fa. Invitrogen mit den zugehörigen Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Das in den diskontinuierlichen Acrylamidgelen enthaltene Protein (Gelatine oder gefärbtes Casein) dient als Substrat für Proteasen. Die Aktivitäten dieser Enzyme können nach der Elektrophorese und anschließender Renaturierung der Proteine und einem Entwicklungsschritt nachgewiesen werden. Casein-Blue-Gele zeigten klare Banden im gefärbten Gel als Bereiche mit proteolytischer Aktivität. Gelatine-Gele wurden mit dem Coomassie-Färbekit Simply Blue gefärbt. Auch hier konnten Proteasen als ungefärbte Gelbanden detektiert werden.

Reagenzien:

- Fertiggele 4-16 % Zymogram Casein-Blue Gel (Invitrogen, EC64152BOX)

Dicke: 1,0 mm

- Fertiggele 10 % Zymogram Gelatine Gel (Invitrogen, EC61752BOX)

Dicke 1,0 mm

- Renaturierungs-Puffer (Invitrogen, LC2670)

enthält 25 % (w/v) Triton X-100

Dieses Pufferkonzentrat wurde kurz vor Gebrauch 1:10 in A. deion. verdünnt.

- Developing-Puffer (Invitrogen, LC2671)

enthält Tris, NaCl, CaCl₂, Brij 35

Dieses Pufferkonzentrat wurde kurz vor Gebrauch 1:10 in A. deion. verdünnt.

Markerproteine:

- Prestained SDS Molecular Weight Standard Mixture; (Sigma, SDS-7B)

α -Macroglobulin	180,0 kDa
β -Galactosidase	116,0 kDa
Fructose-6-Phosphatkinase	84,0 kDa
Pyruvatkinase	58,0 kDa
Fumarase	48,5 kDa
Lactat-Dehydrogenase	36,5 kDa
Triosephosphat-Isomerase	26,6 kDa

- SeeBlue™ prestained Standart (LC 5625)

Myosin	250 kDa
BSA	98 kDa
Glutamin-Dehydrogenase	64 kDa
Alkohol-Dehydrogenase	50 kDa
Carboanhydrase	36 kDa
Myoglobin	30 kDa
Lysozym	16 kDa
Aprotinin	6 kDa
Insulin, B Kette	4 kDa

Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Probenvorbereitung verlief abweichend, ohne Reduzierungs-Reagenz mit Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Herstellerangaben wurde die Renaturierung und Entwicklung durchgeführt. Bei Casein-Gelen erfolgte eine anschließende Coomassiefärbung. mit dem Färbekit Simply-Blue.

3.3.2.1 Färbung mit Coomassie-brillantblau-Färbekit „Simply Blue“

Zur Färbung von Zymogrammen nach der Elektrophorese wurde das kommerzielle Färbekit „SimplyBlue™ SafeStain“ (Invitrogen, LC6060) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Densitometer (Bio-Rad, Typ GS-710) eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Quantity One“ der Firma Bio-Rad.

3.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.3.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF wurde mit der Fokussiereinheit „PROTEAN IEF cell“ der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Reagenzien:

- IEF-Puffer:

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

4 % (w/v) CHAPS

5 mM Tributylphosphin

0,25 % (w/v) Bio-Lyte 3-10 Ampholyt (163-1112) Fa. Bio-Rad

42 g Harnstoff, 15,2 g Thioharnstoff, 4 g CHAPS, 0,125 ml Tributylphosphin und 0,625 ml Bio-Lyte wurden in einen 100 ml Messkolben gegeben und in hochreinem Wasser gelöst. Nach dem Auffüllen auf 100 ml wurde die Lösung Portionsweise (1ml) bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden Spuren von Bromphenolblau hinzugefügt und auf dem Vortex durchmischt.

- IPG-Streifen, 17 cm lang (alle Fa. Bio-Rad)

ReadyStrip IPG Strips, pH 3–10 163-2007

ReadyStrip IPG Strips, pH 4–7 163-2008

ReadyStrip IPG Strips, pH 7–10 163-2012

- Mineralöl (163-2129) Fa. Bio-Rad

- Electrode-wicks (165-4071) Fa. Bio-Rad

Durchführung:

Ca 3 mg (11 mg für spätere Coomassie-Färbung des Gels) des proteinhaltigen Lyophilisats wurden in 400 µl IEF-Puffer aufgenommen. Zur vollständigen Lösung und Denaturierung wurden die Proben mindestens 1 h unter gelegentlichem Vortexen bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden dann 330 µl dieser Lösung in einen Schacht des IEF-Trays gegeben und mit einem IPG-Steifen überdeckt. Eine Überschichtung mit Mineralöl verhinderte eine Austrocknung. Die Rehydratation wurde ohne angelegte elektrische Spannung für 14-16 h bei 20 °C durchgeführt. Nach der Rehydratation wurden mit hochreinem Wasser angefeuchtete Elektroden-Wicks auf die Elektroden des IEF-Trays gelegt und mehrfach während der IEF ausgetauscht. Die Fokussierung erfolgte in mehreren Schritten, wobei als maximaler Stromfluss 75 µA/IPG am Gerät vorgegeben wurden. Dies wurde wie folgt programmiert, jedoch wurde jeder Schritt einzeln überprüft und gegebenenfalls (wenn die programmierte Spannung aufgrund zu hoher Leitfähigkeit und damit verbundenem Stromfluss nicht erreicht wurde) verlängert, bis die angegebene Spannung erreicht wurde. Es wurde darauf geachtet, dass vor dem Wechsel zum nächsten Schritte eine Stromstärke von 50 µA pro IPG nicht überschritten wurde.

- Schritt 1: 200 V (rapider Anstieg) 45 min (teilweise bis zu 4 Stunden)
- Schritt 2: 500 V (rapider Anstieg) 45 min
- Schritt 3: 1000 V (rapider Anstieg) 45 min
- Schritt 4: 10000 V (linearer Anstieg) 4 h
- Schritt 5: 10000 V (rapider Anstieg) ca. 8 h bis ca. 90 bis 100 kVh erreicht wurden.

Die fertig fokussierten IPG-Streifen wurden in Einwegbehältern bei -80 °C für bis zu einen Monat gelagert.

3.3.3.2 Gelelektrophorese

Reagenzien:

- Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)

90,855 g Tris wurden in ca. 400 ml A. deion. gelöst und tropfenweise mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,8 eingestellt. Es wurde auf 500 ml mit A. deion. aufgefüllt.

3 Methoden

- 30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) (161-0158) Fa. Biorad
Enthält Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (w/w).
- 10 % (w/v) SDS-Lösung
10 g SDS wurden in A. deion. gelöst und auf 100 ml mit A. deion. aufgefüllt
- TEMED
(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) Fa. Serva
- 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
20 mg Ammoniumpersulfat wurden in 200µl A. deion. gelöst. Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.
- 40 % Ammoniumpersulfat-Lösung
80 mg Ammoniumpersulfat wurden in 200µl A. deion. gelöst. Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.
- Äquilibrations-Puffer
50 mM Tris/HCl pH 8,8
6 M Harnstoff
30 % (w/v) Glycerin
2 % (w/v) SDS
In einem 200 ml Messkolben wurden 72 g Harnstoff, 60 g wasserfreies Glycerin, 4 g SDS mit 6,6 ml 1.5 M Tris-Puffer pH 8,8 versetzt und mit A. deion. gelöst. Nach dem Temperieren der Lösung im Wasserbad auf Raumtemperatur wurde sie mit A. deion. auf 200 ml aufgefüllt.
- 2-Butanol (wassergesättigt)
50 ml 2-Butanol wurden mit 40 ml A. deion. in einem Schütteltrichter geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die untere, wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase in einer Schraubdeckelflasche aufbewahrt.

- SDS-Tris-Glycin-Laufpufferkonzentrat

150 ml Konzentrat wurden mit 1350 ml A. deion. versetzt und gerührt.

- Agaroselösung 5% in Laufpuffer

5 g Agarose (Serva) wurden mit 10 ml SDS-Tris-Glycin-Laufpufferkonzentrat und 90 ml A. deion. versetzt und im Wasserbad bei 98 °C gelöst. Wenige Kristalle Bromphenolblau wurden zugesetzt. Die Lösung konnte für bis zu 2 Monate bei 4 °C gelagert werden. Vor der Verwendung wurde sie im Wasserbad auf 98 °C gebracht und geschüttelt.

Durchführung:

Es wurde mit der Gelelektrophoreseapparatur Protean II xi (Biorad) gearbeitet. Für zwei 20 cm x 20 cm große Gele wurden bei einer Konzentration von 12 % Acrylamid folgende Reagenzien verwendet:

34 ml A. deion.

25 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)

40 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) (Biorad)

1 ml 10 % SDS in A. deion.

Diese Lösungen wurden bei Raumtemperatur unter Rühren auf dem Magnetrührer zusammenpipettiert. Aus Glasplatten, seitlichen 1-mm-Spacern und Schraubzwingen wurden Kassetten hergestellt, die in dem Gießstand befestigt wurden. Zum Abdichten der Gelkassetten wurde 1 ml Gel-Lösung entnommen, mit 6,5 µl TEMED versetzt, kräftig auf dem Vortex durchmischt und 28 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde kurz geschüttelt und dann sofort zu je 750 µl an den Seiten der Gelkassetten hineingegeben, wo sie innerhalb weniger als einer Minute polymerisierte und fest wurde.

Nach ca. 2 Minuten wurden 50 µl TEMED und 150 µl einer 40 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung als Polymerisations-Katalysatoren unter Rühren in den Rest der Gellösung geben. Entlang einer Glaspipette wurde diese Lösung in die Gelkassetten gegossen, bis sie bis ca. einen cm unter dem Rand gefüllt waren. Damit eine glatte Gelkante entstand, wurde die Lösung mit je ca. 2 ml wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für

mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur, erst danach konnten die Gele bei 4 °C für eine Nacht gelagert werden.

Vor der Gelelektrophorese wurden die IPG-Streifen auf Raumtemperatur gebracht und zweimal für 10 Minuten in je 10 ml Äquilibrationpuffer auf dem Wipptisch gewaschen. Für den ersten Waschschrift wurden zu den 10 ml dieser Lösung 0,1 g DTT hinzugesetzt und unter Schütteln gelöst, für den Zweiten 0,5 g Jodacetamid.

Überstehendes 2-Butanol wurde aus der Gelkassette entfernt und die Gelkante 3-mal mit SDS-Tris-Glycin-Laufpuffer (Biorad) gewaschen. Der fertig äquilibrierte IPG-Streifen wurde kurz in Laufpuffer gewaschen und dann auf die Gelkante gelegt und leicht angedrückt. Ein Elektroden-Wick wurde mit ca. 5 µl Mark 12 Proteinmarker (siehe 3.3.1) versetzt und seitlich in die Gelkassette gesteckt. Mit heißer 0.5 % (w/v) in Laufpuffer aufgelöster Agarose (Serva) wurde der IGP-Streifen blasenfrei überschichtet und damit fixiert. Zur Agaroselösung hinzugefügtes Bromphenolblau sorgte für eine Visualisierung der Laufront. Nach dem Erstarren und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Elektrophoresesandwich, bestehend aus 2 Gelkassetten und einem Kathodenraum, zusammengebaut und der Kathodenraum an die Brauchwasserversorgung angeschlossen, welche die Apparatur im Durchfluss kühlte. In Kathoden- und Anodenraum wurde Laufpuffer gegeben und die Elektrophorese zuerst für 45 min bei 20 mA/Gel und dann für ca. 4,5 h bei 35 mA/Gel durchgeführt. Die Elektrophorese war beendet, wenn die Laufront des Bromphenolblaus die Unterkante des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden dann entnommen und gefärbt.

Die Färbung wurde entweder mit dem kommerziellen Färbe-Kit „SilverXpress Silver Staining Kit“ (LC6100) der Fa. Invitrogen (siehe 3.3.1) durchgeführt oder es erfolgte eine Silberfärbung nach Blum (Blum 1987). Für massenspektrometrische Analysen der Proteinspots wurden eine Silberfärbung nach Shevchenko (1996) oder die Coomassie-Färbung mit „SimplyBlue™ SafeStain“ (Invitrogen, LC6060) durchgeführt. Die Gele wurden nach der Färbung zur Dokumentation mit dem Densitometer (Bio-Rad, Typ GS-710) eingescannt und mit der Software „PD-Quest“ (Bio-Rad) ausgewertet.

3.3.3.3 Silberfärbung nach Blum (1987)

Reagenzien:

- Fixierlösung

200 ml Methanol wurden mit 50 ml konzentrierter Essigsäure und 150 ml A. deion. gemischt. Es wurden 200 µl 37 %ige Formaldehydlösung hinzugesetzt und vorsichtig geschüttelt.

- Waschlösung 1

200 ml Ethanol wurden mit A. deion. auf 400 ml aufgefüllt.

- Vorbehandlungslösung

0,08 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat wurden in 400 ml A. deion. gelöst.

- Imprägnierlösung

0,8 g Silbernitrat wurden in 400 ml A. deion. gelöst und mit 300 µl 37 %iger Formaldehydlösung versetzt und vorsichtig geschüttelt.

- Entwicklerlösung

24 g wasserfreies Natriumcarbonat wurden mit 1,6 ml einer 1 mg/ml Natriumthiosulfatlösung versetzt und in 400 ml A. deion. gelöst. Es wurden 200 µl 37 %iger Formaldehydlösung hinzugefügt und vorsichtig geschüttelt.

- Stopperlösung

200 ml Methanol wurden mit 50 ml konzentrierter Essigsäure und 150 ml A. deion. gemischt.

- Waschlösung 2

200 ml Methanol wurden mit A. deion. auf 400 ml aufgefüllt.

Durchführung:

Auf einem Wipp-Tisch bei Raumtemperatur wurde ein ca. 20 cm x 20 cm großes Gel in einer Färbewanne nacheinander mit jeweils 400 ml der folgenden Lösungen behandelt, die nach Ablauf der entsprechenden Behandlungszeit möglichst schnell und vollständig abgeschüttet wurden. Alle Behandlungszeiten wurden genau

eingehalten um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten; lediglich der Schritt mit der Entwicklungslösung musste visuell überwacht und dann abgebrochen werden, wenn eine ausreichende Färbung erhalten wurde, eine starke Hintergrundfärbung aber noch nicht auftrat. Die Behandlungsschritte und -dauern sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 2 Übersicht der verschiedenen Behandlungsschritte bei der Silberfärbung nach Blum (1987)

Verwendete Lösung	Behandlungsdauer
Fixierlösung	mindestens 1 h, bis zu 3 Tage
Waschlösung 1	20 min
Waschlösung 1	20 min
Waschlösung 1	20 min
Vorbehandlungslösung	60 sec
A. deion.	20 sec
A. deion.	20 sec
A. deion.	20 sec
Imprägnierlösung	20 min
A. deion.	20 sec
A. deion.	20 sec
Entwicklerlösung	2 min -10 min je nach Hintergrundfärbung
A. deion.	2 min
A. deion.	2 min
Stopperlösung	10 min
Waschlösung 2	mindestens 20 min

3.3.4. Massenspektrometrische Proteinidentifikation

3.3.4.1 Enzymatischer Verdau

3.3.4.1.1 Coomassie-brillantblau-gefärbte Gele:

Reagenzien:

- 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

Es wurden 79,1 mg Ammoniumhydrogencarbonat in 100 ml hochreinem Wasser gelöst. Die Lösung ist nur sehr begrenzt haltbar und wurde täglich frisch angesetzt.

- 50 % (v/v) Acetonitril in 5 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

10 ml Acetonitril wurden mit 10 ml 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gemischt.

- 10 mM DTT in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

15,4 mg DTT wurden in 10 ml 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst.

- 55 mM Jodacetamidlösung

101,7 mg Jodacetamid werden in 10 ml hochreinem Wasser gelöst

- Trypsinlösung

Trypsin (Promega V511A) wurde in der Konzentration von 100 ng/μl in 50 mM Essigsäure (Trypsin Resuspension Buffer, Promega V542A) gelöst und portionsweise eingefroren. Als Arbeitslösung wurde die aufgetaute Vorratslösung 1:3 mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung verdünnt.

Durchführung:

Nach dem sorgfältigen Spülen des gefärbten Gels mit hochreinem Wasser wurden die zu identifizierenden Proteinspots in kleinen Stückchen mit einer Pipettenspitze (1000 μl, Eppendorf) vorsichtig ausgestochen und einzeln in „Low-Bind“-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Dort wurden sie dann verschiedenen Wasch- und Reaktionsschritten unterzogen. Die Inkubation fand dabei in einem Eppendorf-Thermo-Mixer bei 180 Upm bei Raumtemperatur statt, wenn nicht anders

angegeben. Nach jedem Schritt wurden die Lösungen wieder vorsichtig vollständig mit der Pipette abgezogen. Die Schritte im Einzelnen waren:

1. 10 min mit 15 µl hochreinem Wasser
2. 10 min mit 15 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
3. 10 min mit 15 µl 50 % (v/v) Acetonitril in 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat
4. 15 min mit 15 µl 10 mM DTT in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 60 °C
5. 15 min mit 15 µl 55 mM Jodacetamid unter Lichtabschluß
6. 10 min mit 15 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
7. 10 min mit 15 µl 50 % (v/v) Acetonitril in 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat
8. 10 min mit 15 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
9. 10 min mit 15 µl 50 % (v/v) Acetonitril in 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat
10. 10 min mit 15 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
11. 10 min mit 15 µl 50 % (v/v) Acetonitril in 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Die Gelstücke wurden für 5 min bei 30 °C in einem Vakuumrotationskonzentrator (Speed-Vac) angetrocknet und dann mit 2 µl frisch aufgetauter Trypsinlösung versetzt. Durch Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur fand der enzymatische Proteinverdau statt. Am nächsten Tag erfolgte die massenspektrometrische Analyse.

3.3.4.1.2 Silbergefärbte Gele

Reagenzien:

- Farmer`s Reducer

40 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat wurden mit 20 mg Kaliumhexacyanoferrat (III) in 10 ml hochreinem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

- 20 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

158,1 mg Ammoniumhydrogencarbonat wurden in 100 ml hochreinem Wasser gelöst. Diese Lösung war nur sehr begrenzt haltbar und wurde jeden Tag frisch angesetzt.

- 45 mM DTT in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

69,4 mg DTT wurden in 10 ml 20 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst.

- 100 mM Jodacetamidlösung

185 mg Jodacetamid werden in 10 ml hochreinem Wasser gelöst.

- 50 % (v/v) Acetonitril in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

10 ml Acetonitril wurden mit 10 ml 20 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gemischt

- Trypsinlösung

Trypsin (Promega V511A) wurde in der Konzentration von 100 ng/µl in 50 mM Essigsäure (Trypsin Resuspension Buffer, Promega V542A) gelöst und portionsweise eingefroren. Als Arbeitslösung wurde die aufgetaute Vorratslösung 1:3 mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung verdünnt.

Durchführung:

Analog zu 3.3.4.1.1 wurden die Gele gewaschen und die Proteinspots ausgestochen. Die nachfolgenden Wasch- und Reaktionsschritte waren jedoch unterschiedlich. Auch hier wurden die einzelnen Lösungen nach jedem Schritt vollständig mit der Pipette entfernt. Alle Schritte wurden bei 180 Upm im Eppendorf Thermo Mixer durchgeführt, soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur.

Die Schritte waren:

1. 10 min mit 100 µl Framer`s Reducer
2. 10 min mit 100 µl Farmer`s Reducer
3. 15 min mit 100 µl hochreinem Wasser
4. 15 min mit 100 µl hochreinem Wasser
5. 15 min mit 100 µl hochreinem Wasser
6. 10 min mit 100 µl 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat
7. 30 min mit 100 µl 45 mM DTT in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 60 °C
8. 30 min mit 100 µl 100 mM Jodacetamid in hochreinem Wasser unter

Lichtabschluss

9. 45 min mit 100 µl 50 % (v/v) Acetonitril in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 37 °C
10. 45 min mit 100 µl 50 % (v/v) Acetonitril in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 37 °C

Die Gelstücke wurden dann für 5 min bei 30 °C in einem Vakuumrotationskonzentrator (Speed-Vac) angetrocknet und mit 2 µl frisch aufgetauter Trypsinlösung versetzt. Durch Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur fand der enzymatische Proteinverdau statt. Am nächsten Tag erfolgte die massenspektrometrische Analyse.

3.3.4.2 MALDI-Massenspektrometrische Analyse

Reagenzien:

- TA-Lösung

0,4 ml 25 %ige Trifluoressigsäure wurden auf 100 ml verdünnt. Von dieser 0,1 %igen Trifluoressigsäure wurden 70 ml mit 30 ml Acetonitril gemischt.

- Matrixlösung

Eine Spatelspitze 4-OH- α -Cyano-Zimtsäure wurde mit 100 µl TA-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß überschichtet und mit dem Vortex gut durchmischt. Diese Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand wurde abgetrennt und diente als Matrixlösung.

- 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung

Es wurden 79,1 mg Ammoniumhydrogencarbonat in 100 ml hochreinem Wasser gelöst. Die Lösung ist nur sehr begrenzt haltbar und wurde täglich frisch angesetzt.

Durchführung:

Zur Co-Kristallisation wurden die über Nacht inkubierten Gelstückchen mit 10 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung versetzt und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. 0,5 µl dieser jetzt peptidhaltigen Lösung wurden im Deckel des Eppendorf-Gefäßes mit 0,5 µl Matrixlösung gemischt und zweimal jeweils 0,5 µl davon auf den Edelstahlprobenhalter gegeben. Die Trocknung (Kristallisation) erfolgte bei Raumtemperatur. Der Probenhalter wurde zur Aufnahme der Spektren ins Spektrometer gegeben. Die erstellten Spektren wurden mit der Software „GPS Explorer Workstation“ (Applied Biosystems) ausgewertet.

Bei niedriger Proteinkonzentration sowie allen silbergefärbten Gelen wurde die Probenaufgabe modifiziert. Es wurden Zip-Tips (Millipore) verwendet. Dabei wurden

die Gelstückchen mit 20 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung versetzt und im Ultraschallbad für 10 min vorbehandelt. Zur Konditionierung wurden die Zip-Tips mit TA-Lösung gespült (3 mal ca. 3 µl). Die so konditionierten Spitzen wurden in die Peptidlösung gegeben und durch 8-maliges Niederdrücken und Loslassen des Pipettierknopfes beladen. Die beladenen Spitzen wurden mit 1 µl Matrixlösung eluiert und auf den Probenhalter zu jeweils 0.5 µl gegeben. Die Trocknung (Kristallisation) erfolgte bei Raumtemperatur.

3.4 Biochemisch präparative Methoden

3.4.1 Reinigung von bakteriellen Alginaten(modifiziert nach Wingender, 1984)

Durchführung

Zur Reinigung von bakteriellen Alginaten aus *P. aeruginosa* wurden 10 PIA-Platten wie unter 3.1.2 beschrieben konfluent beimpft und für 24 h bei 36 °C bebrütet. Der konfluente Bakterienwuchs wurde vorsichtig mit einem Metallspatel abgenommen, 1:16 (w/v) in steriler 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert und unter Rühren (Magnetrührer, 1300 Upm) bei Raumtemperatur für 30 min homogenisiert. Die Suspension wurde für 2 h bei 40000 x g (10 °C) zentrifugiert und der dabei erhaltene Überstand sterilfiltriert (Celluloseacetat-Membranfilter, Porengröße 0,2 µm). Die so erhaltene zellfreie EPS-haltige Lösung wurde unter leichtem Rühren im Eisbad mit dem dreifachen Volumen eiskaltem, vergälltem Ethanol versetzt und 30 min im Eisbad inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde über eine Nutsche (Schott, Nutsche Nr. 3) abfiltriert und auf der Nutsche zweimal mit eiskaltem vergälltem Ethanol und abschließend einmal mit eiskaltem absolutem Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde fünf Tage im Vakuum-Exsikkator über P₄O₁₀ getrocknet. Das getrocknete Rohexopolysaccharid wurde in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in sterilem 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, mit 2 mM MgCl₂ gelöst. Nach Zugabe von Benzonase (Merck) bis zu einer Endkonzentration von 5 U/ml wurde der Ansatz 4 h bei 36 °C inkubiert. Nach Zugabe von frisch hergestellter, sterilfiltrierter Proteinase K-Lösung (Sigma, gelöst in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, mit 2 mM MgCl₂; Endkonzentration: 5 µg/ml), wurde der Ansatz weitere 24 h bei 36 °C inkubiert und anschließend für 30 min bei 20000 x g (10 °C) zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde bei 4 °C zunächst 1 h und anschließend über Nacht gegen 5 l A.

deion. dialysiert (regenerierte Cellulose, Porenweite 2,5 nm, Fa. Serva, Visking dialysis tubing) und abschließend gefriergetrocknet.

3.4.2 Teilreinigung einer Alginat-Lyase von *Klebsiella aerogenes* Typ 25 (modifiziert nach Lange et al, 1989)

Durchführung:

Es wurde ein Einzelkolonieausstrich auf NBA-Agar hergestellt, welcher über Nacht bei 36 °C bebrütet wurde. Davon wurde eine Vorkultur hergestellt, indem eine Einzelkolonie in 50 ml NBA-Flüssigmedium gegeben wurde und die Kultur für 24 h im Schüttelwasserbad bei 37 °C und 180 upm inkubierte. Für die Hauptkultur wurden 800 ml frischer NBA mit 0,4 ml der Vorkultur beimpft und diese für 24 h bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die entstandene Bakteriensuspension wurde bei 16000 x g für 20 min zentrifugiert, die entstanden Zellpellets wurden vereinigt und in 50 ml B-Per II (Pierce) Extraktionspuffer resuspendiert. Diese Suspension wurde für 15 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und dann bei 27000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst für eine Stunde gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 7) und dann über Nacht gegen 50 mM Phosphatpuffer dialysiert.

Das Dialysat wurde dann einer 2-stufigen Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Im ersten Schritt wurde Ammoniumsulfat sehr langsam bis zur 50 %igen Sättigung bei 4 °C hinzugefügt und dann nach 3 h bei 4 °C für 20 min bei 15000 x g zentrifugiert. Dem Überstand wurde nun weiter langsam Ammoniumsulfat hinzugefügt, bis eine Sättigung von 90 % erreicht war. Diese Lösung wurde übernacht auf Eis gelagert und dann bei 15000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 10 ml Phosphatpuffer, pH 7, aufgenommen und dann über Nacht gegen Tris-Puffer, pH 8,5, dialysiert. Zur weiteren Reinigung wurde die proteinhaltige Lösung auf eine 32 cm lange Chromatographiesäule (Innendurchmesser 1,6 cm) mit DEAE-Sepharose CL 6B gegeben. Laufmittel war 50 mM Tris-Puffer, pH 8,5, mit 20 ml/h. Sie wurde mit 2 M NaCl in 50 mM Tris pH 8,5 eluiert und die ersten 20 ml nach dem Ausschlussvolumen enthielten die Alginat-Lyase. Die so gereinigte Lösung wurde mit A. deion. verdünnt oder unverdünnt für weitere Versuche verwendet und konnte bei -20 °C gelagert werden.

3.4.3 Isolierung der Proteine der äußeren Membran (modifiziert nach Poxton et al., 1985)

Zur Isolierung der Proteine der äußeren Membran von *P. aeruginosa* wurden 10 PIA-Platten, wie unter 3.1.2 beschrieben, konfluent beimpft und für 24 h bei 36 °C bebrütet. Der konfluente Bakterienwuchs wurde vorsichtig mit einem Metallspatel abgenommen, 1:16 (w/v) in steriler 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert und unter Rühren (Magnetrührer, 1300 Upm) bei Raumtemperatur für 30 min homogenisiert. Die Bakterien wurden durch 30 min Zentrifugation bei 16000 x g abgetrennt und einmal in 0,01 mM HEPES-Puffer pH 7,4 gewaschen und in 40 ml HEPES-Puffer suspendiert. Durch Beschallung mit Ultraschall (12 x 30 sec, 90 Watt) unter Eiskühlung wurden die Zellen aufgebrochen und die intakten Zellen durch 10 min. Zentrifugation bei 6000 x g abgetrennt. Zur Suspension wurde tropfenweise Natrium-N-Lauroyl-sarkosin einer 30 %igen (w/v) Lösung hinzugefügt bis eine Endkonzentration von 0,7 % (w/v) erreicht war. Nach 20 min Inkubation mit gelegentlichem Schwenken mit der Hand bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 60 min bei 40000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit A. deion. gewaschen und in 2 ml A. deion. resuspendiert.

Zur IEF wurde diese Suspension 1 : 1 mit IEF-Puffer gemischt und wie in 3.3.3.1 beschrieben verwendet.

3.5 Physikalisch-Chemische Methoden

3.5.1 Gelpermeationschromatographie von zellfreien EPS-Lösungen

3.5.1.1 Sephacryl S-500 HR

Vorgequollenes Sephacryl S-500 High Resolution (Pharmacia) wurde dreimal mit 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 mit 0,2 M NaCl gewaschen. Anschließend wurde das Gel/Puffer-Volumenverhältnis auf ca. 3:1 eingestellt, das Gel mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast und mittels eines Packreservoirs in eine Chromatographiesäule geschichtet. Die Packung erfolgte für 2 h bei einer Flussrate von 50 ml/h und anschließend für 1 h bei einer Flussrate von 70 ml/h. Es wurden folgende Versuchsbedingungen verwendet:

3 Methoden

Säuleninnendurchmesser:	1,6 cm
Gelbetthöhe:	95 cm
Gelbettvolumen:	191 ml
Flussrate:	15 ml/h
Elutionsmittel:	50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, mit 0,2 M NaCl
Fraktionsvolumen:	2,0 ml
Anzahl der Fraktionen:	124
Probenvolumen:	5 ml

Kalibrierung (HMW Gel Filtration Calibration Kit; Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, 17-0441-01):

Blue Dextran	$2,0 \times 10^6$ Da
--------------	----------------------

Proteine zur Kalibrierung

Thyroglobulin	669 kDa
Ferritin	440 kDa
Katalase	232 kDa
Aldolase	158 kDa

Die Säule wurde mit ca. dem dreifachen Säulenvolumen 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 mit 0,2 M NaCl bei einer Flussrate von 15 ml/h äquilibriert. Das Ausschlussvolumen der Säule wurde mit hochmolekularem Blue-Dextran ermittelt. Dazu wurde 2 ml Dextran-Lösung (2,5 mg/ml) in 0,14 M NaCl-Lösung aufgetragen und mit 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, mit 0,2 M NaCl eluiert. In den aufgefangenen Fraktionen wurde die Kohlenhydratkonzentration (3.2.1.1) bestimmt. Anschließend wurde die Säule mit ca. 500 ml Eluent gewaschen. Kalibriert wurde die Säule mit verschiedenen hochmolekularen Proteinen (5 mg/ml in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, mit 0,2 M NaCl). Es wurden jeweils 2,0 ml der Lösungen auf die Säule aufgetragen und mit 50 mM Tris-HCl-Lösung, pH 8, mit 0,2 M NaCl eluiert und in den Fraktionen die Proteinkonzentration anhand der Absorption der einzelnen Fraktionen bei 280 nm gegen A. deion. bestimmt. Zwischen den einzelnen Läufen wurde die Säule jeweils mit dreifachem Säulenvolumen an Eluenten gewaschen.

Zur Bestimmung der Elutionsprofile der EPS-Lösungen (siehe 3.1.2) wurde je 5 ml EPS-Lösung aufgetragen und mit 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, mit 0,2 M NaCl

eluiert. In den aufgefangenen Fraktionen wurden dann jeweils photometrisch die Kohlenhydratkonzentration (3.2.1.1) und die Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm gegen A. deion. bestimmt.

3.5.1.2 Sephacryl S-200 HR

Vorgequollenes Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) wurde dreimal mit 50mM Tris-Puffer pH 8 mit 0,2 M NaCl gewaschen. Nach Einstellung des Verhältnisses Gel zu Puffer (3:1) wurde die Suspension mit einer Wasserstrahlpumpe entgast und mit Hilfe des Packreservoirs in die Säule gefüllt. Für die Packung der Säule wurden zunächst 2 Stunden lang 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 mit 0,2 M NaCl mit 60 ml/h und dann 1 Stunde mit 100 ml/h auf die Säule gegeben.

Säulendurchmesser:	1,6 cm
Gelbetthöhe:	93 cm
Gelbettvolumen:	187 ml
Flussrate:	15 ml/h
Elutionsmittel:	50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 mit 0,2 M NaCl
Fraktionsvolumen:	2,0 ml
Anzahl der Fraktionen:	124
Probenvolumen:	5 ml

Die Kalibration der Säule erfolgte mit dem LMW Gel Filtration Calibration Kit; Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, 17-0442-01).

Es wurden die folgenden Proteine verwendet:

BSA	67 000 Da
Ovalbumin	43 000 Da
Chymotrypsinogen	25 000 Da
Ribonuklease A	13 700 Da

Blue Dextran ($M = 2,0 \times 10^6$ Da) wurde zur Bestimmung des Ausschlussvolumens verwendet. Die Säule wurde wie in 3.5.1.1 beschrieben verwendet.

3.5.2. Viskosimetrie

Die Viskosität von EPS-haltigen Kulturüberständen wurde mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters (Mikro-KPG-Ubbelohde-Viskosimeter, Kapillare I, Schott) im Vergleich zum verwendeten Lösungsmittel (0,14 M NaCl-Lösung) bei $25\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ bestimmt. Die Proben wurden im Viskosimeter 15 min bei $25\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ vortemperiert und anschließend die Durchflusszeiten bestimmt. Es wurden fünf Messwerte pro Probe ermittelt. Die spezifische Viskosität wurde mit Hilfe der Durchflusszeiten berechnet:

Spezifische Viskosität

$$\eta_{\text{spez}} = \frac{t_p - t_l}{t_l}$$

η_{spez} : spezifische Viskosität

t_l : Durchlaufzeit des Lösungsmittels

t_p : Durchlaufzeit der Probe

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine biochemische Charakterisierung der EPS

Die EPS von auf *Pseudomonas*-Isolierungs-Agar (PIA) gewachsenen Biofilmen des mucoiden Stamms *P. aeruginosa* SG81 wurden mit photometrischen Testverfahren auf ihre biochemischen Summenparameter überprüft. Für die Herstellung zellfreier EPS-Lösungen wurden über 24-72 h bei 36 °C gewachsene Bakterienrasen abgeschabt und in der 15-fachen Masse 0.14 M NaCl-Lösung suspendiert und für 30 min durch Rühren homogenisiert. Um die Zellen zu entfernen, wurde die erhaltene homogene Suspension 2 Stunden bei 40000 g zentrifugiert und der Überstand durch einen Membranfilter der Porenweite 0.2 µm sterilfiltriert. Zum Entfernen niedermolekularer Bestandteile des extrazellulären Materials wurden die erhaltenen Lösungen über Nacht gegen A. deion. dialysiert (cut off = 12000-14000 g/mol). Als EPS werden für diese Arbeit also die Substanzen definiert, deren Masse über 12-14 kDa beträgt. Die Zusammensetzung der so gewonnenen Proben ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3 Mittelwerte (n=5) der biochemischen Parameter der nach 3.1.2 hergestellten EPS-Lösungen (dialysiert), in Abhängigkeit des Biofilmmalters nach Bebrütung bei 36 °C auf PIA

Parameter: [µg/ml EPS Lösung]	24 h Biofilmmalter	48 h Biofilmmalter	72 h Biofilmmalter
Proteine	298 ± 27	310 ± 35	318 ± 25
Kohlenhydrate	720 ± 83	690 ± 86	695 ± 75
Uronsäuren (Alginat)	622 ± 74	593 ± 55	530 ± 62

Der Vergleich der Zusammensetzung der EPS-Lösungen in Abhängigkeit des Biofilmmalters zeigt: Die Proteinkonzentration zeigt einen sehr leichten Anstieg. Die Kohlenhydratkonzentration bleibt über den untersuchten Zeitraum nahezu konstant, der Uronsäureanteil, also die Alginatkonzentration, nimmt innerhalb von 72 h leicht ab. In früheren Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass es sich bei den Uronsäuren in den EPS von *P. aeruginosa* SG81 um das Polysaccharid Alginat handelt (Grobe et al., 1995).

EPS-Proben, die vor der Dialyse biochemisch analysiert wurden, zeigten ungefähr doppelt so hohe Proteinkonzentrationen, der Kohlenhydratgehalt war um ca 15 % höher, der Uronsäuregehalt um ca 30 % (Werte nicht gezeigt). Da sie aber durch

Dialyse entfernt werden konnten, ist ihre molare Masse relativ gering (unter 12000 bis 14000 g/mol) und sie werden damit nicht zu den EPS gezählt.

4.2 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nativer EPS

Für die gelelektrophoretische Trennung der extrazellulären Proteine wurde zellfreie EPS-Lösung hergestellt. Durch Fertiggele gelang mit einem Gel der Konzentration 12 % Acrylamid und Tris-Glycin-Laufpuffer unter reduzierenden Bedingungen (mit DTT) ein Nachweis extrazellulärer Proteine und ihre Auftrennung in ca. 30 Banden unterschiedlicher Intensität (siehe Abb. 8). Der Größenbereich der Proteine lag zwischen 18 und 96 kDa. Relativ starke Banden waren vor allem bei ca. 24 und 33 sowie 57 kDa erkennbar. Wenn für die SDS-PAGE die EPS-Lösung durch Gefriertrocknung zunächst konzentriert wurde und das Lyophilisat in Probenpuffer aufgenommen wurde, war die Trennung der einzelnen Proteine nicht möglich, die einzelnen Spuren auf dem Gel wurden diffus, lediglich 6 Proteinbanden wurden eindeutig erkennbar, die Lauffront war innerhalb der Spur sehr unregelmäßig, was zu stark verzerrten Banden führte (Gel nicht gezeigt).

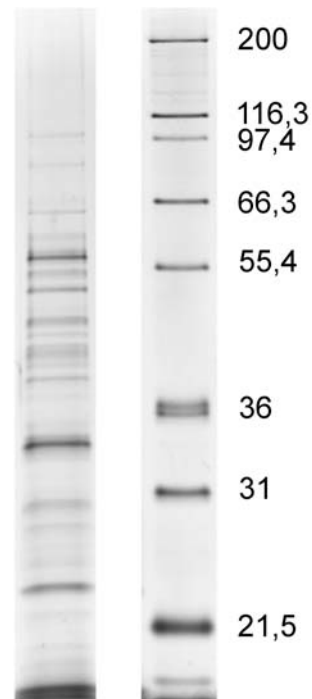


Abb. 8 SDS-PAGE von Proteinen einer zellfreien EPS-Lösung. Die Gewinnung der EPS erfolgte aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Anzucht bei 36 °C für 24 h auf PIA. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit der Silberfärbung SilverXpress Silver staining Kit. In der rechten Spur des Gels ist der Proteinmarker Mark 12 aufgetragen. Die Zahlen entsprechen den molaren Massen in kDa. Aufgetragen wurden 11 µl EPS-Lösung (entsprechend 3,3 µg Protein) auf ein Gel mit 12 % Acrylamidkonzentration.

4.2.1 Zymogrammgelelektrophorese zum Nachweis proteolytischer Aktivität

Der elektrophoretische Nachweis proteolytischer Enzymaktivität in der EPS-Lösung wurde mit Zymogrammgelelektrophorese durchgeführt. Dadurch können aktive Enzyme nachgewiesen und dabei ihre apparente Größe bestimmt werden. Dafür wurde die EPS-Lösung nach 3.1.2 hergestellt und dann mit Probenpuffer auf ein Casein- oder Gelatine-haltiges Gel (als Substrat) gegeben. Nach der Elektrophorese wurden die Gele renaturiert, damit die Enzyme in ihre aktive Konformation übergehen können, und dann ca. 16 h bei 36 °C inkubiert. Proteaseaktivität konnte dadurch nachgewiesen werden, dass in dem Bereich, in dem sich das Enzym nach dem elektrophoretischen Lauf befindet, das Proteinsubstrat abgebaut wurde. Da dies entweder schon vorgefärbt war (Blue Casein) oder hinterher angefärbt wurde (Gelatine), zeichneten sich Bereiche mit proteolytischer Aktivität durch Farblosigkeit im sonst gefärbten Gel aus.

Es konnten, wie in Abb. 9 gezeigt, zwei Proteasen in den EPS nachgewiesen werden. Ihre molare Masse wurde anhand vorgefärbter Proteinmarker auf etwa

125 kDa und 54 kDa bestimmt. Aufgrund der Anwesenheit dieser aktiven Proteasen wurde bei den weiteren elektrophoretischen Analysen der EPS-Lösungen der Proteaseinhibitor Pefabloc [4-(2-Aminoethyl)benzylsulfonylfluorid Hydrochlorid] in der Konzentration 1 mg/ml zugesetzt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Proteine während der Weiterbehandlung nicht enzymatisch abgebaut werden.

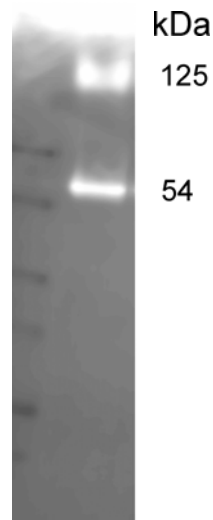


Abb. 9 Zymogramm-Gel mit Gelatine als Substrat. Aufgetragen wurde ein EPS-Sterilfiltrat eines 24-h-Biofilms. Die Zahlen rechts kennzeichnen die entsprechenden apparenten molaren Massen in kDa. Auf der linken Seite ist der Marker zu erkennen. Es wurden 12 µl EPS-Lösung (entsprechend 3,6 µg Protein) aufgetragen.

4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese nativer EPS

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der extrazellulären Proteine mittels der 2D-GE, deren erster Schritt die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist. Als zweiter Schritt folgt eine SDS-PAGE mit anschließender Färbung der Proteine. Wenn gefriergetrocknete EPS für die IEF eingesetzt wurden, zeigte sich ein Ergebnis der 2D-GE, welches keine scharfe Trennung der Proteine in der x-Achse, also anhand ihres isoelektrischen Punkts, aufwies. In Abb. 10 ist ein Ergebnis einer solchen Analyse gezeigt. Bei der IEF fiel auf, dass der Stromfluss immer relativ hoch war. Die eingestellten elektrischen Spannungen wurden aufgrund des begrenzten maximalen Stromflusses erst nach mehreren Stunden erreicht. Es kam bei vielen Fokussierungen zu Lichtbogenentladungen, die den IPG-Streifen zerstörten. Das erzeugte 2D-Gel eines intakten IPG-Streifens zeigte dann, dass die Proteine nicht

fokussiert wurden, da sie nicht in distinkten Proteinspots erschienen, sondern als Streifen über fast die gesamte Breite des Gels angefärbt wurden.

Unterschiedliche Zusammensetzungen des IEF-Puffers (Variation von Detergenzkonzentration, Reduktionsmittel sowie Ampholytkonzentration) sowie unterschiedlich lange Fokussierzeiten (von 20 kVh bis 400 kVh) wurden ausprobiert, um eine andere Fehlerquelle auszuschließen. Diese Versuche zeigten keine Verbesserung im Trennergebnis der IEF, das Trennergebnis ähnelte der Abb. 10.

Da die Durchführung einer eindimensionalen SDS-PAGE erfolgreich verläuft (siehe Abb. 8), ist davon auszugehen, dass in der analysierten Probe Stoffe enthalten sind, welche die IEF stören. Vermutlich handelt es sich dabei um den mengenmäßig dominierenden Teil, die sauren Kohlenhydrate. Dies ist hauptsächlich das Alginat, welches als Polyelektrolyt negativ geladen ist. Diese Moleküle migrieren ebenfalls in der IEF und stören dabei die Wanderung der Proteine. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden Methoden zur Proteinanreicherung bzw. deren Trennung von anderen EPS-Bestandteilen angewendet.

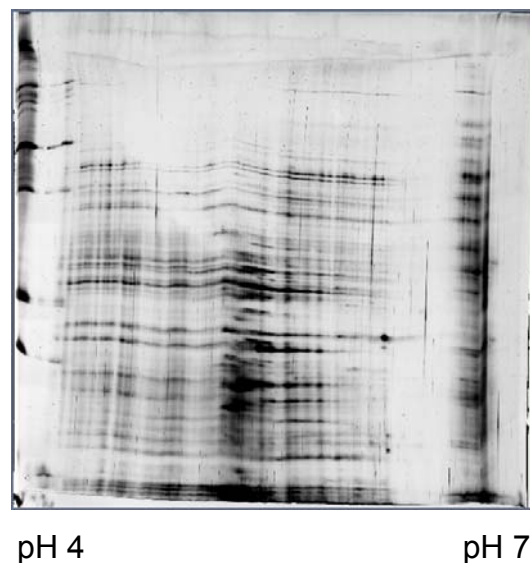


Abb. 10 Silbergefärbte 2D-GE von 2 mg EPS-Lyophilisat eines 24-h-Biofilms von *P. aeruginosa*. Der IPG-Streifen hat einen Bereich von 4-7. Eine starke Streifenbildung erfolgt durch Störungen der IEF.

4.4 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Um die Proteine von den Kohlenhydraten zu trennen, wurde die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) angewendet. Hierbei handelt es sich um eine häufig verwendete Methode der Fällung (extrazellulärer) Proteine aus wässrigen Lösungen zur Konzentrierung und anschließender Analyse. Es wurden verschiedene Mengen

an kristalliner TCA zur EPS-Lösung gegeben und die Ansätze für 4 h im Eisbad bei 0 °C gelagert. Im Konzentrationsbereich von 5-70 % (w/v) erfolgte dabei keine Trübung und keine Präzipitation, durch Zentrifugation wurde kein Pellet erhalten, eine Proteinabtrennung war dadurch nicht möglich.

4.5 Ausfällung des Alginats mit Kalziumchlorid

Es ist bekannt, dass bakterielle Alginat mit Kalziumionen schwerlösliche Salze in Gelform bilden (Govan und Harris, 1986). Es wurde deshalb versucht, mit Kalziumchlorid das Alginat auszufällen und somit von den in Lösung verbleibenden Proteinen zu trennen. Zu 30 ml zellfreier EPS-Lösung wurde unter Rühren 6 ml 100 mM CaCl_2 -Lösung gegeben, Vergleichsansätze wurden mit dem gleichen Volumen A. deion. versetzt. Dabei fiel bei Kalziumzusatz eine voluminöse gelartige Substanz aus (ca. 70 % des Ursprungsvolumens der EPS-Lösung), die nach 30 min Lagerung bei 0 °C durch Zentrifugation (1 h, 40000 x g) abgetrennt wurde. Die biochemische Analyse der Überstände ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 Biochemische Parameter der EPS-Überstände nach Fällung mit CaCl_2 ; angegeben ist der Mittelwert von 4 unabhängigen Versuchen.

Parameter [µg/ml]	EPS-Überstand + A. deion. (Kontrolle)	EPS-Überstand + 100 mM CaCl_2 -Lösung (Fällung)
Proteine	597 ± 48	643 ± 52
Kohlenhydrate	951 ± 133	257 ± 27

Die Ergebnisse der Analysen zeigen eine Ausfällung von Kalziumalginat, welches durch die Zentrifugation abgetrennt werden konnte. Der größte Teil der mit CaCl_2 versetzten Suspension bildete ein unlösliches Gel, sodass nach dem Zentrifugieren nur wenig Volumen an Überstand übrig blieb. Allerdings ist dabei auch ein Teil der Proteine mit ausgefallen bzw. durch die Gelbildung aus der Lösung entfernt worden, denn sonst hätte sich die Konzentration der Proteine in dem Überstand stark erhöhen müssen. Es zeigt sich dort aber nur eine relativ geringe Erhöhung der Proteinkonzentration. Eine Co-Präzipitation der Proteine ist also wahrscheinlich.

Der Überstand wurde über Nacht gegen A. deion. dialysiert und dann gefriergetrocknet. Das so gewonnene Lyophilisat wurde direkt in IEF-Puffer gelöst

und für die 2D-GE verwendet. Eine Reproduktion des dadurch gewonnenen Proteinspotprofils gelang jedoch nicht (siehe Abb. 11), meist war dazu eine starke horizontale Streifenbildung im gefärbten Gel sichtbar.

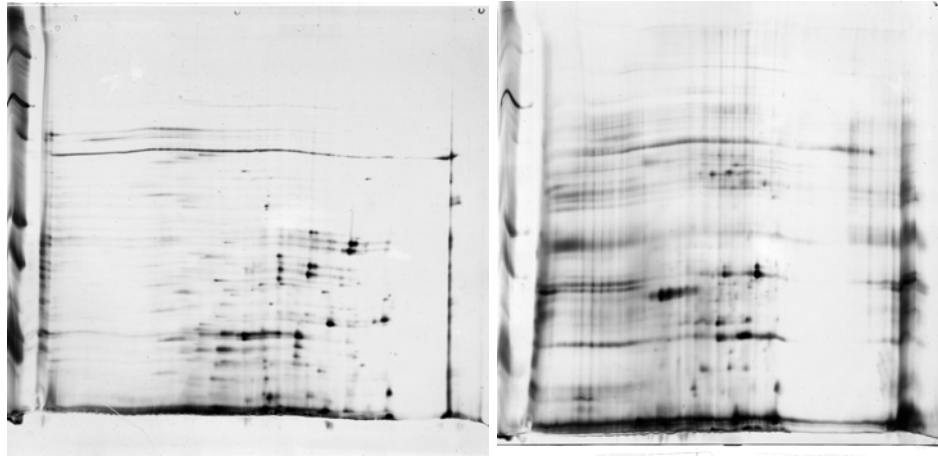


Abb. 11 2D-GE von 2 mg EPS-Lyophilisat, gewonnen nach Abtrennung von Alginat durch Ausfällung mit CaCl_2 . Der IPG-Streifen hat einen Fokussierbereich von pH 4-7. Abgebildet sind zwei unterschiedliche Aufarbeitungen, die reproduzierbare Darstellung eines Proteinspotmusters gelang nicht.

4.6 Gelpermeationschromatographie von EPS

Zur Charakterisierung und Trennung der EPS-Bestandteile wurde die Methode der Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration) verwendet. Es wurden 2 verschiedene Trenngele als Füllmaterial verwendet. Sephacryl S-500 HR zeigt den besten Fraktionierungsbereich für hochmolekulare Dextrane im Bereich von 20 kDa bis 2000 kDa, für Proteine werden hierfür keine Angaben gemacht (Produktinformation Fa. Amersham). Es wurde auch Sephacryl S-200 HR verwendet, bei dem das Trennoptimum für globuläre Proteine im Größenbereich von 5 kDa bis 250 kDa liegt, Dextrane werden im Bereich von 1 kDa bis 80 kDa fraktioniert (Produktinformation Fa. Amersham). Die Säulen wurden mit verschiedenen kommerziellen Eichproteinen kalibriert. Das Ausschlussvolumen wurde mit hochmolekularem Dextran (MW = 5000 KDa) sowie Dextranblau (MW = 2000 KDa) bestimmt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf die Summenparameter Proteine, Gesamtkohlenhydrate und Uronsäuren untersucht. Die Proteine wurden jedoch nicht biochemisch mit dem Lowry-Assay bestimmt, sondern ihr Verlauf anhand der ermittelten UV-Absorption bei 280 nm detektiert.

4.6.1 Verwendung von Sephacryl S-500 HR

Das Trenngel Sephacryl S-500 HR wurde verwendet, um eine weitergehende Charakterisierung der EPS-Bestandteile durchzuführen und dabei eine Auftrennung der Kohlenhydratfraktion zu erreichen und die Proteine im späteren Elutionsverlauf gemeinsam aufzunehmen. Das Elutionsdiagramm für die mit diesem Trennmateriale gepackte Säule zeigt, dass eine komplette Auftrennung der EPS in die Stoffgruppen Kohlenhydrate und Proteine nicht möglich ist. Es zeigt sich teilweise eine Überlappung der Konzentrationsverläufe von Proteinen und Kohlenhydraten. Im hochmolekularen Bereich auf der linken Seite des in Abb. 12 gezeigten Elutionsprofils sind fast ausschließlich Kohlenhydrate, und zwar Uronsäuren, zu finden. Über einen weiten Bereich bilden Kohlenhydrate den Hauptbestandteil des Eluats. Erst im späteren Elutionsverlauf können dort auch Proteine nachgewiesen werden, allerdings fast immer vergesellschaftet mit Kohlenhydraten. Der Uronsäuregehalt geht im niedermolekularen Bereich schneller zurück als der Kohlenhydratgehalt. Die Proteine eluieren nicht in distinkten Peaks von der Säule.

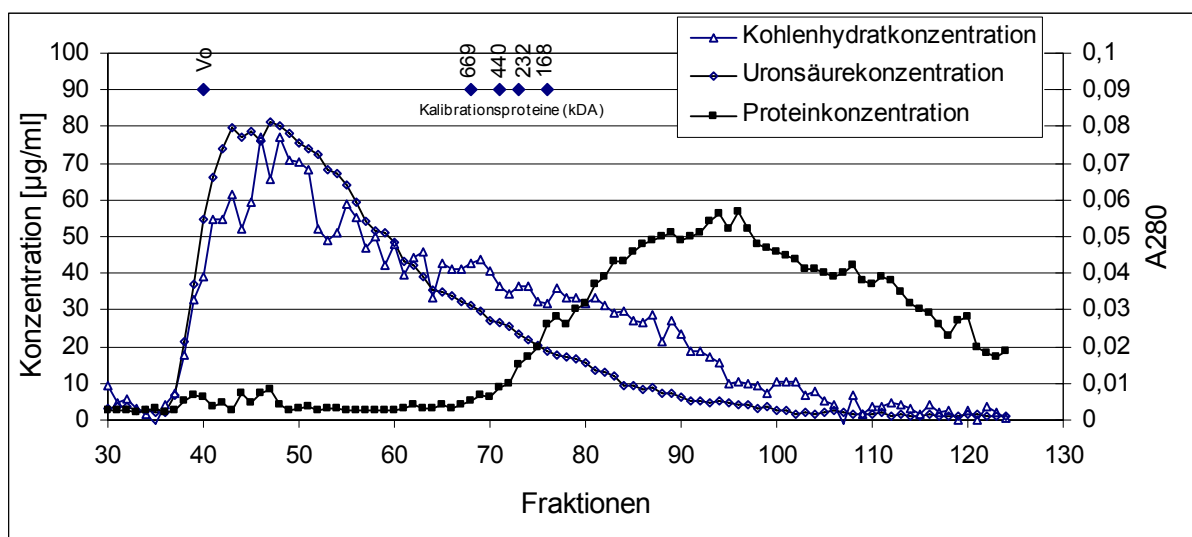


Abb. 12 Elutionsprofil einer mit Sephacryl S-500 HR gepackten Chromatographiesäule. Aufgetragen wurden 5 ml EPS-Lösung, Eluent war 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8 mit 0,2 M NaCl, das Fraktionsvolumen betrug 2 ml. Das Ausschlussvolumen (V_0) wurde mit hochmolekularem Dextran ermittelt.

Beim Zusatz der Aminosäure L-Arginin zur EPS-Lösung zur möglichen Verbesserung der Trennleistung (durch die vermutete Störung der Bildung von Kohlenhydrat-Protein-Addukten), verändert sich das Elutionsprofil derart (siehe Abb. 13), dass der Proteinpeak etwas steiler wird. Während in früheren Fraktionen (35-48 sowie 70-80)

weniger Protein nachgewiesen werden kann, nimmt die Konzentration im Bereich der Fraktionen, in denen ohne Argininzusatz die höchsten Proteinkonzentrationen gemessen wurden, noch leicht zu (Fraktionen 85-98).

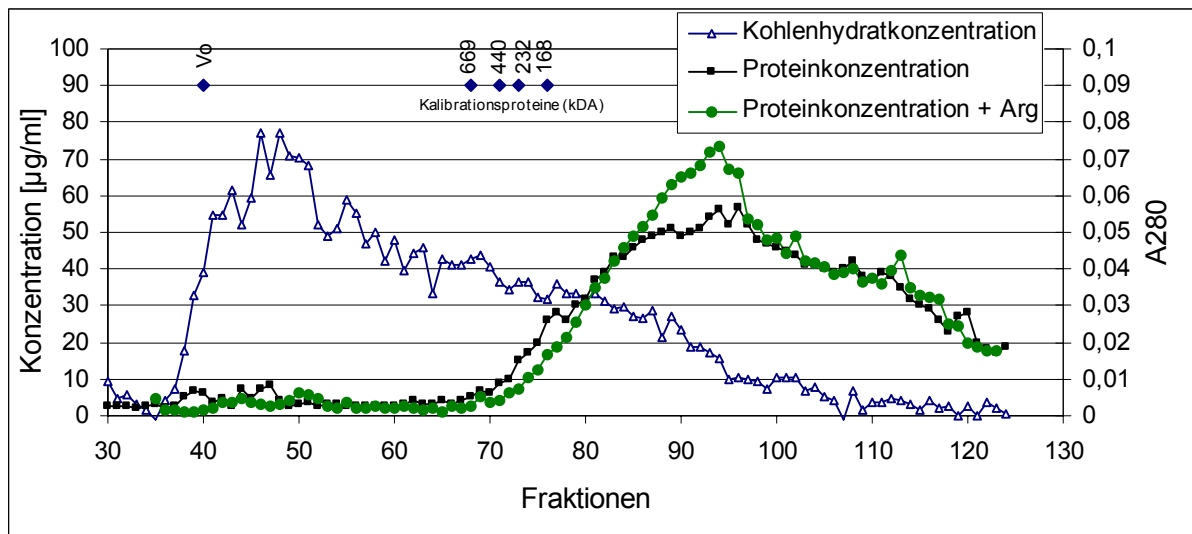


Abb. 13 Elutionsprofil einer mit Sephacryl S-500 HR gepackten Chromatographiesäule. Aufgetragen wurden 5 ml EPS-Lösung, zusätzlich ist das Elutionsprofil für die Proteinkonzentration eingezeichnet, bei dem die EPS-Lösung mit 3 mg/ml L-Arginin versetzt wurde. Eluent war 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8 mit 0,2 M NaCl, das Fraktionsvolumen beträgt 2 ml. Das Ausschlussvolumen(V_0) wurde mit hochmolekularem Dextran ermittelt.

Späte Fraktionen (z. B. 76-124) dieser chromatographischen Trennung, welche nur wenig Kohlenhydrat und das meiste Protein enthalten, wurden vereinigt, dialysiert und durch Gefriertrocknung konzentriert. Wurden diese Proben der 2D-GE unterzogen, konnten keine reproduzierbaren Proteinspotprofile erzeugt werden. Es gelang selten einzelne Proteinspots zu fokussieren, einheitliche Spotmuster waren aber nicht zu erzielen (Gele nicht gezeigt).

4.6.2 Verwendung von Sephacryl S-200 HR

Mit dem Trenngel Sephacryl S-200 HR sollte der Kohlenhydratanteil der EPS in einem geringen Fraktionsbereich von der Säule eluiert und so von dem Proteinanteil getrennt werden. Die Verwendung dieses Trennmaterials zeigt in Abb. 14 gezeigten Elutionsprofil eine begrenzte Trennung der Proteine und Kohlenhydrate. Vor allem die Proteine zeigen einen breiteren Elutionsbereich. Ab der Fraktion 70 sind ca 75 % des Gesamtkohlenhydratgehalts von der Säule eluiert. Zur besseren Übersicht sind nur die Kohlenhydrat- und Proteinkonzentrationen eingezeichnet.

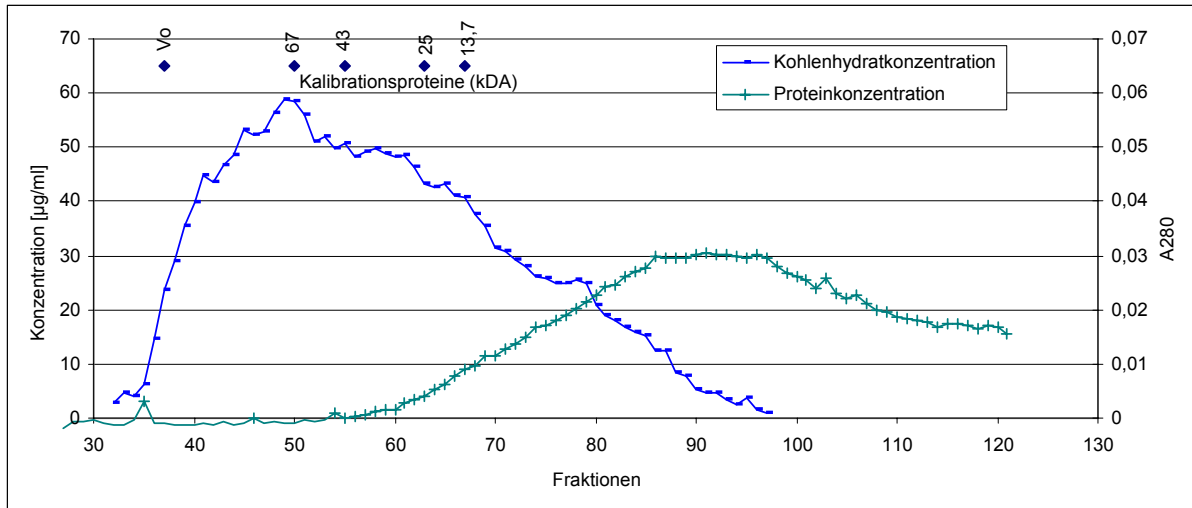


Abb. 14 Elutionsprofil einer mit Sephacryl S-200 HR gepackten Chromatographiesäule. Aufgetragen wurden 5 ml EPS-Lösung, mit 3 mg/ml L-Arginin versetzt. Eluent war 50 mM Tris, pH 8 + 0,2 M NaCl. Das Ausschlussvolumen (V_0) wurde mit Dextranblau ermittelt.

Auch nach dieser chromatographischen Trennprozedur wurden verschiedene proteinreiche Fraktionen (z. B. 70-118 oder 85-133) vereinigt und über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde gefriergetrocknet und zur IEF eingesetzt. Auch hier war kein reproduzierbares Proteinprofil durch 2D-GE zu erhalten, häufig waren die gefärbten Gele mit starken horizontalen Streifen durchzogen, fokussierte Proteinspots waren nicht reproduzierbar (Gele nicht gezeigt).

4.7 Enzymatischer Alginatabbau durch Lyasebehandlung

Um das Alginat als Hauptbestandteil der EPS aus der Lösung zu entfernen, wurden verschiedene Alginat-Lyasen unterschiedlicher Herkunft eingesetzt. Durch anschließende Dialyse zur Entfernung der Spaltprodukte sollte die Alginatkonzentration hinreichend gesenkt werden und sich damit das Ergebnis der IEF deutlich verbessern. Auf die Eignung ihrer Verwendung wurden die folgenden Enzyme getestet:

4 Ergebnisse

1. Teilgereinigtes Enzym von *Klebsiella aerogenes* type 25 (nach Lange et al., 1989), Guluronat-spezifisch
2. Teilgereinigtes Enzym aus *Cytophaga* sp. R3 (von Kampen, 1991), Guluronat-spezifisch
3. Kommerzielles Enzym aus *Flavobacterium* sp. (Fa. Sigma), keine Spezifität vom Hersteller angegeben

Um die drei Lyasen miteinander zu vergleichen und die am besten geeignete zu ermitteln, wurden Reaktionskinetiken über 60 min aufgenommen und die Spaltprodukte mit Hilfe der TBA-Reaktion nachgewiesen. Als Substrate wurden ein kommerzielles Algenalginat (Manucol LHF) als Positivkontrolle und gereinigtes Alginat von *P. aeruginosa* SG81 verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass es sich innerhalb der analysierten Zeitperiode um einen linearen Anstieg der Abbauprodukte handelte. Der Proteingehalt der Lyasenisolats und der käuflichen Lyaselösung wurde mittels Lowry-Assay bestimmt. Aus den ermittelten Kinetiken wurden die in Tabelle 5 angegebenen Lyaseaktivitäten bestimmt und auf den Proteingehalt der Lyaselösung bezogen.

Tabelle 5 Zusammenfassung der Aktivitäten dreier Alginatlyasen bei zwei verschiedenen Substraten. Die Enzymeinheit (U) wurde definiert als die Enzymaktivität, die 1 nmol β -Formylpyruvat pro min freisetzt. Der enzymatische Abbau wurde bei 37 °C in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 durchgeführt.

Substrat	Lyase-Aktivität [U/ μ g Protein]		
	<i>K. aerogenes</i>	<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Flavobacterium</i> (Sigma)
gereinigtes Bakterienalginat von <i>P. aeruginosa</i> SG81	0,27	0,64	0,89
Algenalginat	0,33	0,52	0,35

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die isolierten Lyasen keine starke Präferenz für Algen- oder Bakterienalginat haben, während die kommerzielle Lyase gegenüber Bakterienalginat etwa doppelt so aktiv ist wie gegenüber Algenalginat. Ihre Aktivität ist dabei die höchste der untersuchten Enzyme.

4 Ergebnisse

Um den Effekt der enzymatischen Reaktion auf die EPS der Biofilme von *P. aeruginosa* SG81 zu untersuchen wurde die Lyase von *Flavobacterium* sp. zu EPS-Sterilfiltraten (dialysiert und nicht dialysiert) gegeben. Es wurden jeweils 10 U pro ml EPS Lösung Alginat-Lyase hinzugefügt und die Ansätze bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Depolymerisierung wurden vor Lyasebehandlung, nach Lyasebehandlung (4 h und 24 h) und nach anschließender Dialyse Viskositätsmessungen mittels Kapillar-Viskosimetrie durchgeführt. Bestimmt wurde dabei die spezifische Viskosität. Außerdem wurde die Uronsäurekonzentration sowie die TBA-Reaktivität zur Überprüfung des Alginatabbaus in allen Proben bestimmt, da durch die enzymatische Reaktion nichtreduzierende Zuckerenden entstehen. Es ergaben sich dabei die in Tabelle 6 aufgeführten Messwerte (Mittelwerte der Dreifachbestimmungen einer repräsentativen Probe):

Tabelle 6 Untersuchung des enzymatischen Abbaus von Alginat in einer EPS-Lösung von *P. aeruginosa* SG81 unter Einsatz einer kommerziellen Alginat-Lyase (*Flavobacterium* sp.)

Undialysierte EPS

Inkubationszeit (h)	Spezifische Viskosität		Reaktion im TBA-Test [nmol Formylpyruvat]/ml		Uronsäuregehalt [µg/ml]	
	vor Dial.	nach Dial.	vor Dial.	nach Dial.	vor Dial.	nach Dial.
0	3,36	5,12	1,32	0,76	1245	898
4	0,07	0,12	6,01	19,42	834	773
24	0,08	0,17	6,11	16,44	1076	813

Dialysierte EPS

Inkubationszeit (h)	Spezifische Viskosität		Reaktion im TBA-Test [nmol Formylpyruvat]/ml		Uronsäuregehalt [µg/ml]	
	vor Dial.	nach Dial.	vor Dial.	nach Dial.	vor Dial.	nach Dial.
0	5,12	5,12	0,76	0,76	898	898
4	0,3	1,59	8,17	6,70	942	843
24	0,15	0,79	10,67	9,25	939	762

Aus der Tabelle ergibt sich, dass:

- die Viskosität der EPS-Lösung durch Lyasebehandlung signifikant gesenkt wurde und nach Dialyse geringfügig zunahm;
- die Viskosität der unbehandelten, dialysierten Probe gegenüber der undialysierten Probe stark zunahm;
- eine Verlängerung der Inkubationszeit von 4 h auf 24 h lediglich bei der Lyasebehandlung mit vorausgehender Dialyse eine weitere Verringerung (Halbierung) der Restviskosität bewirkte.

Die weiteren Tests ergaben, dass:

- die TBA-Reaktivität durch die Lyasebehandlung stark gesteigert wurde. Dies ist ein Hinweis auf weitreichenden Abbau des Alginats.
- der Uronsäuregehalt (und damit der Gehalt an Alginat) durch die nach der Lyasebehandlung folgende Dialyse um ca. 16 % (4 h) bis 24 % (24 h) gesenkt werden konnte.

4.7.1 Untersuchung der vorbehandelten Proben für die Eignung zur 2D-GE

Es wurde untersucht, ob eine Vorbehandlung mit einer Alginat-Lyase ausreicht, die Konzentration des Alginats soweit herabzusetzen, dass eine Trennung der extrazellulären Proteine durch 2D-GE erfolgreich durchführbar ist. Zu EPS-Sterilfiltraten wurden jeweils 10 U/ml der verschiedenen Alginat-Lyasen gegeben und bei 37 °C für jeweils 4 h inkubiert. Die Proben wurden über Nacht gegen A. deion dialysiert und gefriergetrocknet. Jeweils 2 mg Lyophilisat wurden für die 2D-GE verwendet; es gelang bei keiner Probe distinkte Proteinspots zu erhalten (siehe Abb. 15).

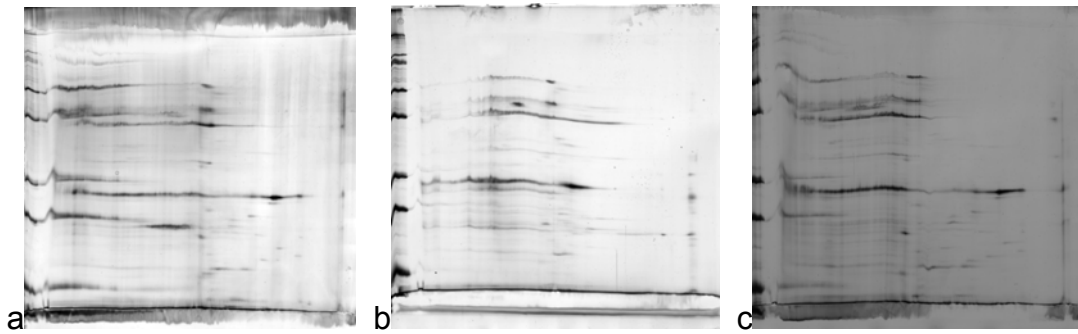


Abb. 15 Anwendung von Alginat-Lyasen verschiedener Spezies (a = *Cytophaga* sp. b = *K. aerogenes* c = *Flavobacterium* sp.) auf EPS-Sterilfiltraten zur 2D-GE. Nach 4 h Inkubation von 10 U/ml Alginat Lyase wurden 2 mg zuvor dialysierte und lyophilisierte EPS für je einen IPG-Streifen (pH 4-7) verwendet.

4.8 Ultrafiltration

Die Möglichkeit, hochmolekulare Polysaccharide von Proteinen zu trennen, wurde durch Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran untersucht, welche Proteine passieren lässt, jedoch das Alginat am Durchtritt hindern soll. Dafür wurde zellfreie EPS-Lösung in eine gerührte Amicon-Ultrafiltrationszelle gegeben. Die Zelle war mit einer Ultracel YM-100 Membran (regenerierte Cellulose, Fa. Millipore) bestückt, welche nominell eine Ausschlussgröße von 100 kDa besitzt. Zur Bestimmung der Trennqualität der Ultrafiltration wurde die Kohlenhydrat- sowie die Proteinkonzentration der Ausgangslösung und des Filtrats gemessen und das Ergebnis in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7 Untersuchung der Rückhaltung von Kohlenhydraten in zellfreier EPS-Lösung durch Ultrafiltration (Mittelwerte von 5 unabhängigen Untersuchungen).

	Ausgangslösung [µg/ml]	Filtrat [µg/ml]
Kohlenhydrat	951 ± 133	723 ± 85
Protein	597 ± 48	552 ± 32

Es wurden bei der Ultrafiltration dieser Lösung nur ca 25 % der Gesamtkohlenhydratkonzentration von der Membran zurückgehalten. Die Proteine konnten zu ca. 93 % die Membran passieren. Auf die Verwendung dieser Lösung zur

2D-GE wurde verzichtet, da die verbleibende Menge an Alginat die IEF sehr wahrscheinlich stört.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob eine vorhergehende Dialyse der EPS-Lösung gegen A. deion zu einer Verbesserung des Trennergebnisses führt und die Ergebnisse in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8 Untersuchung der Rückhaltung von Kohlenhydraten in dialysierter zellfreier EPS-Lösung durch Ultrafiltration (Mittelwerte von 5 unabhängigen Untersuchungen).

	Vor Ultrafiltration [µg/ml]	Filtrat [µg/ml]
Kohlenhydrat	720 ± 118	108 ± 34
Protein	298 ± 27	253 ± 29

Wenn die EPS-Lösung vorher über Nacht gegen A. deion. dialysiert wurde, stieg die Trennleistung der Ultrafiltration stark an. Ebenfalls positiv für die Trennleistung war eine Wiederverwendung der Ultrafiltrationsmembranen. Ihre optimale Trennleistung erreichten sie erst nach Filtration von ca. 150 ml EPS-Lösung.

Es gelang so eine Verminderung der Kohlenhydratkonzentration durch Ultrafiltration auf ca. 15 % des Ausgangswertes. Die Proteinkonzentration nahm dabei bis auf einen Wert von ca. 85 % der Ausgangskonzentration ab. Das Filtrat wurde also stark Kohlenhydrat-abgereichert, die Proteinkonzentration sank dabei nur geringfügig.

Die so vorbereitete EPS-Lösung wurde danach gefriergetrocknet und konnte zur IEF verwendet werden. Daraus erstellte 2D-Elektropherogramme erwiesen sich als reproduzierbar; die Ergebnisse dieser Trennungen werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

4.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE)

Die Analyse der Proteine durch 2D-GE wurde in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt. Für die IEF wurden kommerzielle lineare immobilisierte pH-Gradienten der pH-Bereiche 3-10, 4-7 und 7-10 verwendet. Die zweite Schritt, die SDS-PAGE, erfolgte in einem selbst hergestellten Gelsystem mit 12 % Polyacrylamidkonzentration.

4.9.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur IEF wurden zeitabhängige Reihenuntersuchungen gemacht, welche ergaben, dass eine recht lange Fokussierzeit (mehr als die vom Hersteller empfohlenen 60 kVh) für die Untersuchung der extrazellulär vorkommenden Proteine nötig ist (Daten nicht gezeigt). Dazu wurde bei identischen Proben einer EPS-Aufarbeitung mit durchgeführter Ultrafiltration eine Variation der Fokussierdauer durchgeführt und das sich ergebende Proteinmuster durch die anschließende SDS-PAGE mit der Silberfärbung visualisiert. Die besten Ergebnisse wurden mit Fokussierungen von etwa 90 kVh erreicht. Für alle weiteren Untersuchungen wurde dann dieser Fokussierungsumfang eingehalten.

Die Ausnahme bildeten mit Coomassie-Brillantblau gefärbte Gele mit hoher Proteinbeladung, bei denen der Fokussierungsumfang etwa 110 kVh betrug.

4.9.2 IEF-Puffer

Für den Puffer wurde eine neue Rezeptur entwickelt, welche aus einem Harnstoff-Thioharnstoffgemisch, dem zwitterionischen Detergenz CHAPS, einem Reduktionsmittel sowie einem kommerziellen Trägerampholytgemisch besteht (siehe 3.3.3.1), welche es ermöglicht, die Proteine in reduzierter Form zu fokussieren. Dafür wurde das gewöhnlicherweise in IEF-Puffern verwendete Reduktionsmittel DTT durch Triphenylphosphin ersetzt. Ebenso wurde zur besseren Solubilisierung der Proteine statt Harnstoff ein Gemisch aus Thioharnstoff und Harnstoff verwendet. Die Ampholytkonzentration wurde gering gewählt, um eine geringe Leitfähigkeit des Puffers zu erhalten. Die verwendete Probenlösung hatte eine relativ hohe Eigenleitfähigkeit aufgrund der darin enthaltenen Polyelektrolyte (Alginat). Bei den verwendeten hohen Spannungen kann es, verbunden mit der hohen Eigenleitfähigkeit der Probesubstanz, schnell zur thermischen Zersetzung des IPG aufgrund des hohen Stromflusses kommen. Die eingebaute Kühlung des IEF-Geräts reichte dann meist nicht aus. Dies geschah häufig, wenn IEF-Puffer mit einer Ampholytkonzentration von 0.5 % (w/v) oder höher verwendet wurde. Um dies zu vermeiden wurde die Konzentration an Trägerampholyten auf 0.25 % (w/v) begrenzt.

4.9.3 IEF-Programm

Entgegen der Herstellerangaben der IPG-Streifen (Bio-Rad) wurde ein neues IEF-Programm entwickelt (siehe Punkt 3.3.3.1), welches sich dadurch auszeichnete, dass die Spannung, im Gegensatz zu dem vom Hersteller empfohlenen Programm, nicht in wenigen Schritten relativ schnell anstieg, sondern langsamer und in mehreren Schritten mit längerer Verweildauer erhöht wurde. Somit wurde verhindert, dass es zu Lichtbogenentladungen kam, die den IPG-Streifen zerstörten, was bei einem Fokussierprogramm nach Herstellerangaben häufig geschah.

4.9.4 Erfassung des Proteinprofils

4.9.4.1 Ermittlung der optimalen Aufgabemenge an EPS-Lyophilisat

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass bei der verwendeten Silberfärbung (Blum et al., 1987) die optimale Menge an EPS-Lyophilisat etwa 2,5 mg/IPG-Streifen beträgt. Damit ist es möglich, viele auch nur in geringer Konzentration vorhandene Proteine nachweisen zu können, ohne dass starke Übersättigungseffekte der Färbung auftraten.

Lediglich bei Proteingelen, die für die massenspektrometrische Analyse verwendet wurden und aus Gründen der besseren Analysierbarkeit mit Coomassie-Brillantblau gefärbt wurden, lag die Konzentration bei etwa 9 mg/IPG-Streifen. Bei höherer Beladung der IPG-Streifen war eine IEF nicht mehr erfolgreich durchführbar, jedoch konnten Proteine, die in sehr geringer Konzentration in den EPS auftraten, mit dieser Färbung dann nicht visualisiert werden.

4.9.4.2 Profil extrazellulärer Proteine aus Biofilmen von *P. aeruginosa*

In den Abb. 16-29 sind silbergefärbte Gele zu sehen. Gezeigt werden nur Gele, welche in mindestens drei unterschiedlichen EPS-Aufarbeitungen identische Proteinspotprofile zeigten. Alle Gele wurden aus lyophilisierten Filtraten der Ultrafiltration von dialysierten EPS-Lösungen erstellt. Für die IEF wurden dabei IPG-Streifen mit unterschiedlichen Fokussierbereichen gewählt, der pH Bereich lag bei 3-10, 4-7 und 7-10.

Der Bereich der IEF liegt in Abb. 16 zwischen pH 3 und pH 10. Es zeigen sich über 100 distinkte Proteinspots im Größenbereich zwischen 18 und 98 kDa. Die meisten dieser Proteinspots haben einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 7,5.

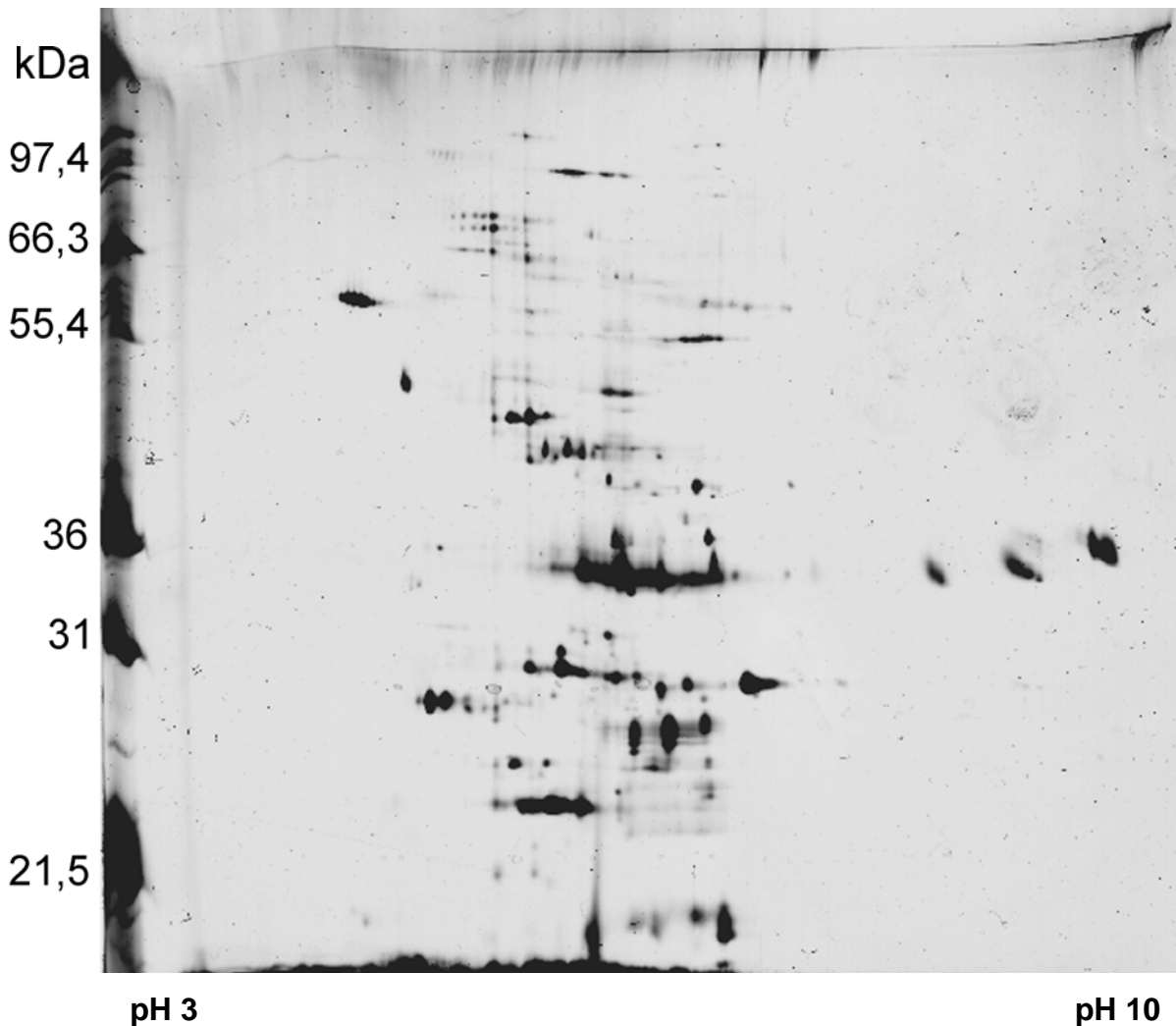


Abb. 16 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 24 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 3 und 10 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

Bei Verwendung eines IPG-Streifens des pH-Bereichs 7-10 (Abb. 17) erkennt man eine deutlich bessere Auftrennung von etwa 20 Proteinen mit einem alkalischen isoelektrischen Punkt zwischen 8,5 und 9,5 welche auf Gelen mit einem pH-Bereich 3-10 nicht deutlich aufgelöst wurde (Abb. 16). Ihre apparente molare Masse beträgt zwischen 33 und 36 kDa. Zahlreiche nicht in Spots aufgelöste Proteine sind im Bereich pH 7 zu finden. Dieser pH-Bereich ist also ungeeignet zur Auflösung der

meisten extrazellulären Proteine mit Ausnahme der hier im alkalischen Bereich visualisierten Proteine.

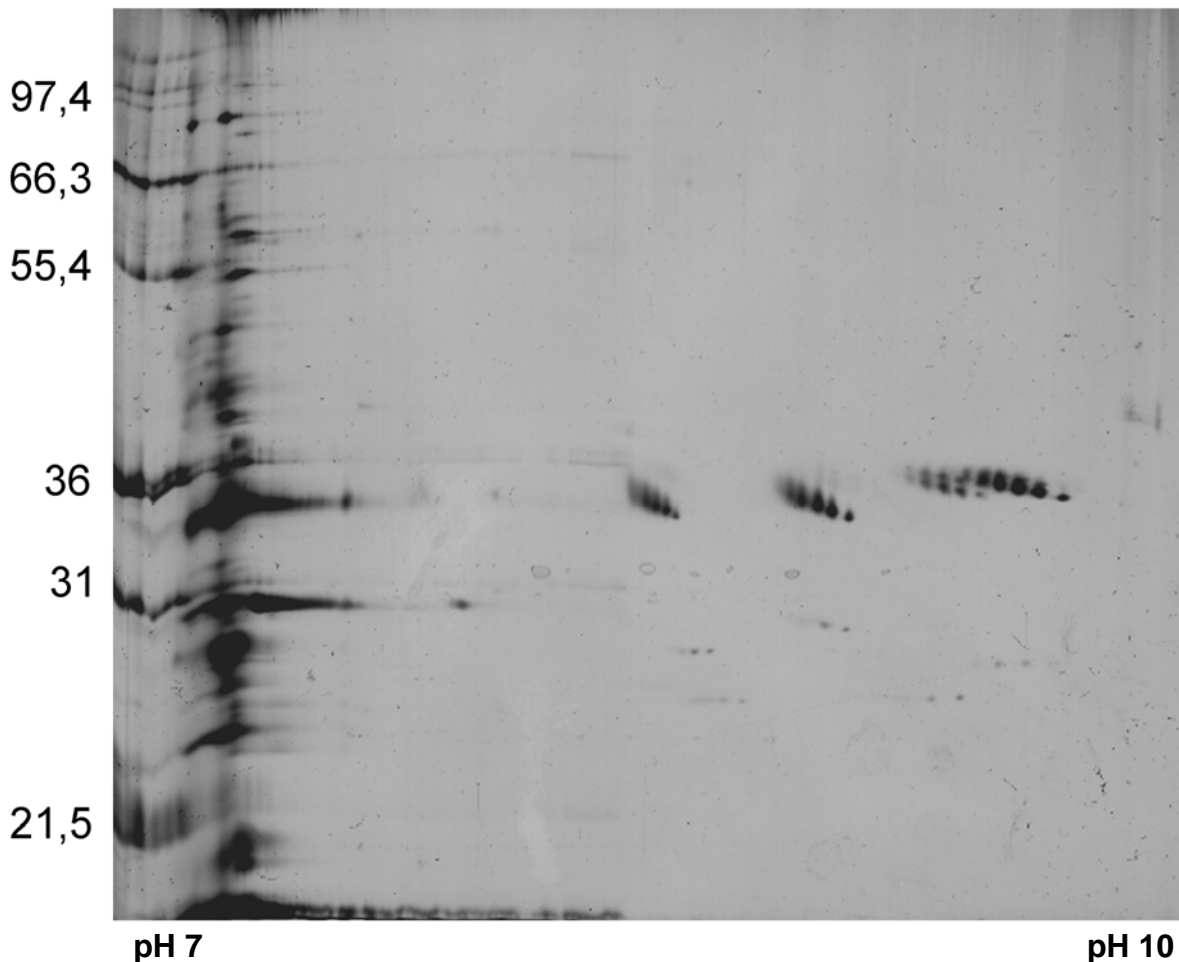


Abb. 17 2D-Elektrophorese von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C für 24 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 7 und 10 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

Bei der Fokussierung im pH-Bereich zwischen 4 und 7 (Abb. 18) sind über 80 Proteinspots reproduzierbar aufgetrennt worden. Der Bereich um $pI = 5,5$ und $MW = 35$ kDa ist aufgrund der relativ großen Menge eines einzigen Proteins leicht übersättigt. Im Gel teilweise auftretende vertikale Streifenbildung ist nur mit der Silberfärbung detektierbar und relativ leicht von Proteinspots unterscheidbar. Eine leicht gekrümmte Lauffront ist im oberen Bereich des Gels erkennbar und sorgt für eine geringe Verschiebung der Lokalisation der Proteinspots. Dies ist ein Phänomen, welches häufiger bei verschiedenen Gelen auftrat. Eine eindeutige Spotidentifikation ist dennoch möglich, da nicht nur einzelne Spots verschoben werden, sondern die

Gesamtheit leicht verzerrt wird. Der Vergleich mit anderen Gelen ist aufgrund der relativ geringen Spotanzahl einfach und legitim.

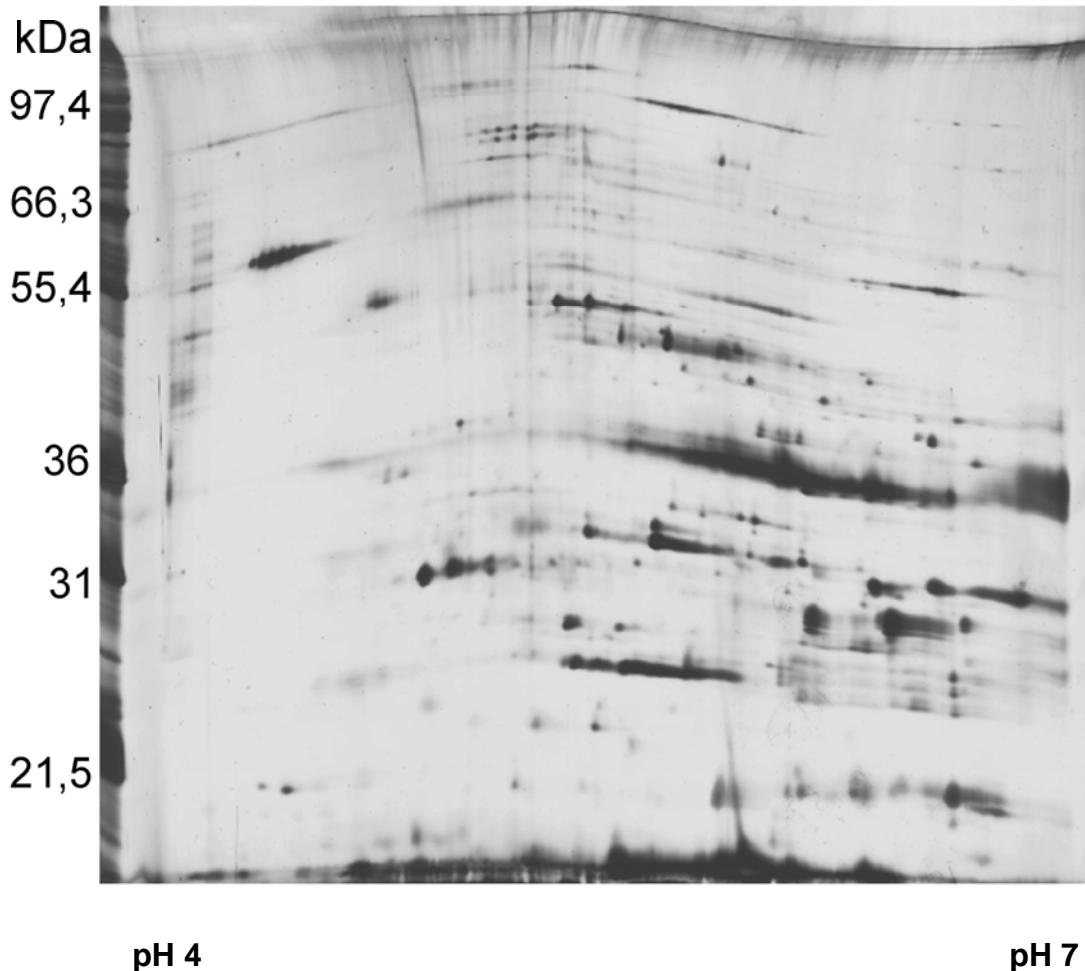


Abb. 18 2D-Elektrophorese von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C für 24 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 4 und 7 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

4.9.4.3 Vergleich von Proteinen der äußeren Membran und extrazellulärer Proteine

Zum Vergleich des Ursprungs wurden Proteine der äußeren Membran (OM-Proteine) des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* SG81 isoliert und unter gleichen Bedingungen wie die extrazellulären Proteine über die 2D-GE getrennt. Wenn Proteinspots auf beiden Gelen an gleicher Stelle zu finden sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich dabei um identische Proteine handelt, diese also aus der äußeren Membran stammen. In Abb. 19 ist ein Vergleich zweier 2D-GE Gele des pI-Bereichs 4-7 zu sehen. Verglichen werden dabei die mit der Sarkosyl-

Methode (siehe 3.4.3) isolierten Proteine der äußeren Membran des im Biofilm gewachsenen Bakteriums *P. aeruginosa* SG81 und die extrazellulär im Biofilm vorliegenden Proteine. Beide Proben sind unter identischen Anzuchtbedingungen (24 h Bebrütung bei 36 °C auf PIA) des Biofilms gewonnen worden.

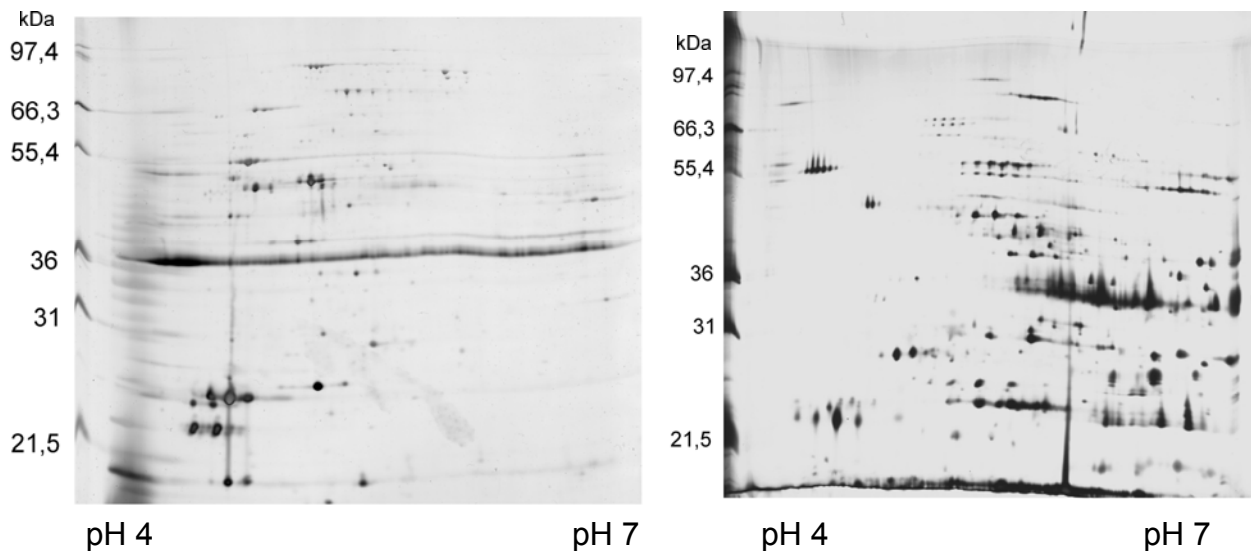


Abb. 19 Vergleich zweier 2D-Gele mit dem Fokussierbereich pH 4-7. Es werden Proteine der äußeren Membran, isoliert durch die Sarkosyl-Methode (links), mit extrazellulären Proteinen aus den EPS eines Biofilms von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 24 h, verglichen.

Bei den OM-Proteinen ist im Bereich von 22 bis 26 kDa und dem pI von 4,5 bis 5 eine Spotgruppe zu finden, welche wohl zumindest teilweise auch bei den Biofilmproteinen zu finden ist. Die Lage der Proteine mit MW = 97 kDa und MW = 80 kDa (pI = 5,5 bzw pI = 6) ist bei beiden Gelen sehr ähnlich. Teilweise scheinen auch manche anderen Proteinspots ähnliche Positionen in beiden Gelen zu haben. Der verwendete IEF-Puffer ist nicht in der Lage, das oder die Proteine der äußeren Membran mit MW = 36 kDa zu solubilisieren, eine reproduzierbare horizontale Linie ist die Folge. Einige der extrazellulär vorliegenden Proteine scheinen also der Herkunft nach OM-Proteine zu sein, der überwiegende Teil der extrazellulär vorliegenden Proteine stammt aber wahrscheinlich nicht aus der äußeren Membran.

4.9.4.4 Zeitabhängigkeit der extrazellulären Proteinexpression

Die Unterschiede der extrazellulären Proteinprofile im Biofilm wurden bei einem Biofilmalter von 24 h, 48 h und 72 h untersucht. Damit sollte festgestellt werden, ob manche Proteine erst nach einer gewissen Zeit extrazellulär im Biofilm zu finden sind

und auch, ob Proteine existieren, welche nur in einem relativ kurzen Zeitintervall extrazellulär zu finden sind.

Es zeigte sich, dass die Veränderung zwischen einem Biofilm nach 24 h Wachstum und einem Biofilm, der bis zu 72 h gewachsen ist, relativ gering ist. Wie auf den Abb. 20-23 zu erkennen ist, erfolgt hauptsächlich eine Veränderung der Proteinkonzentration (welche auch in Tabelle 3 aufgeführt wurde) in den auf den folgenden Seiten markierten Bereichen der Abbildungen.

Die Anzahl und die Lage der im Gel detektierten Proteine ist im untersuchten Zeitraum recht geringen Änderungen unterworfen. Die Intensität der Spots ist jedoch unterschiedlich.

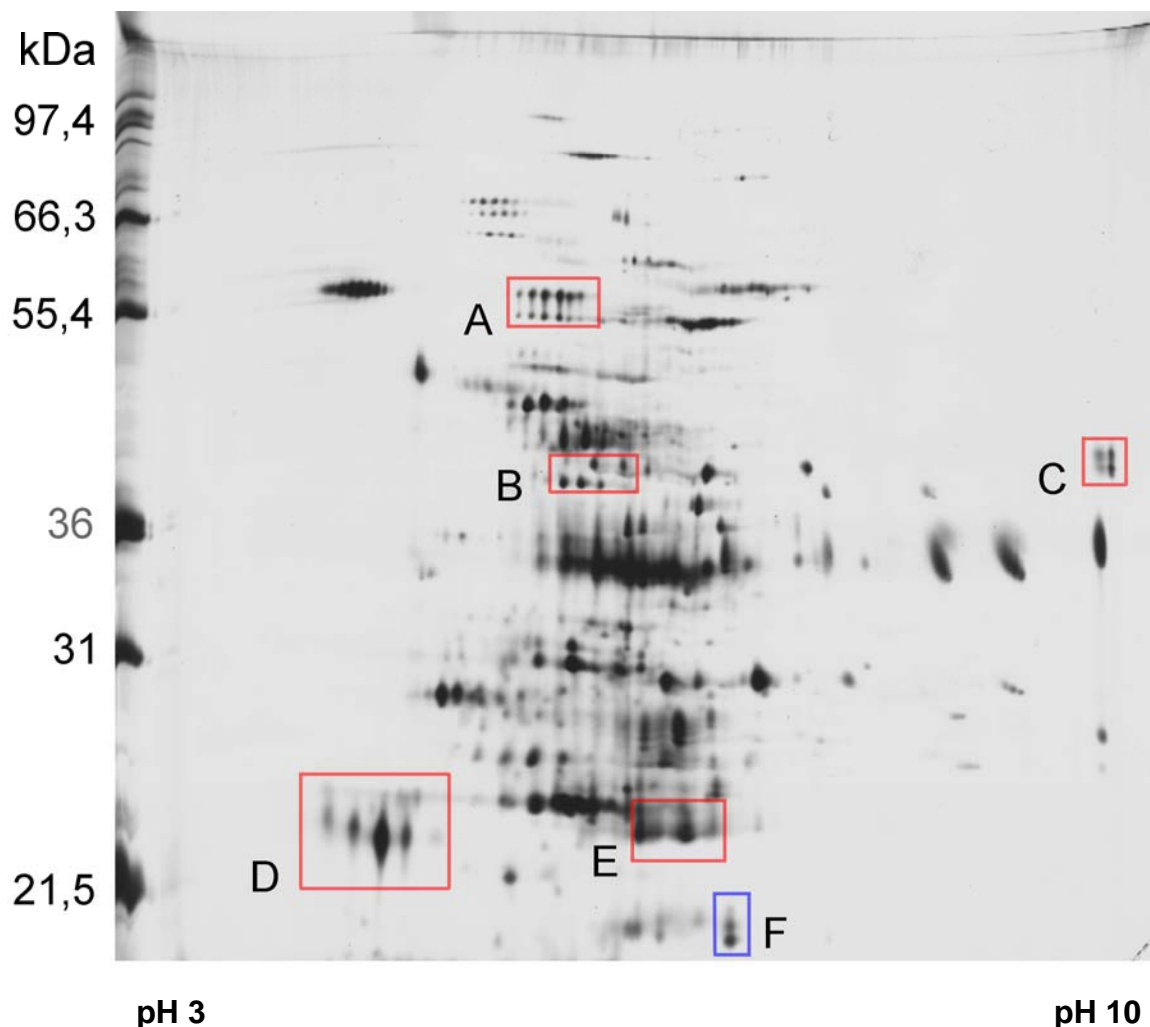


Abb. 20 2D-Elektrophorese von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 48 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 3 und 10 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

In Abb. 20 ist die durch visuellen Vergleich detektierte Proteinmenge trotz gleicher verwendeter Menge an EPS-Lyophilisat angestiegen. In den markierten Bereichen sind im Proteinprofil in Abhängigkeit vom Biofilmalter die stärksten Veränderungen erkennbar. In den rot umrandeten Bereichen (A-E) des Gels sind verglichen mit einem 24 h alten Biofilm entweder neue Proteinspots entstanden oder aber vorhandene in ihrer Intensität verstärkt worden. Im blau umrandeten Bereich (F) sind die Proteinspots entgegen des allgemeinen Trends in ihrer Intensität vermindert worden.

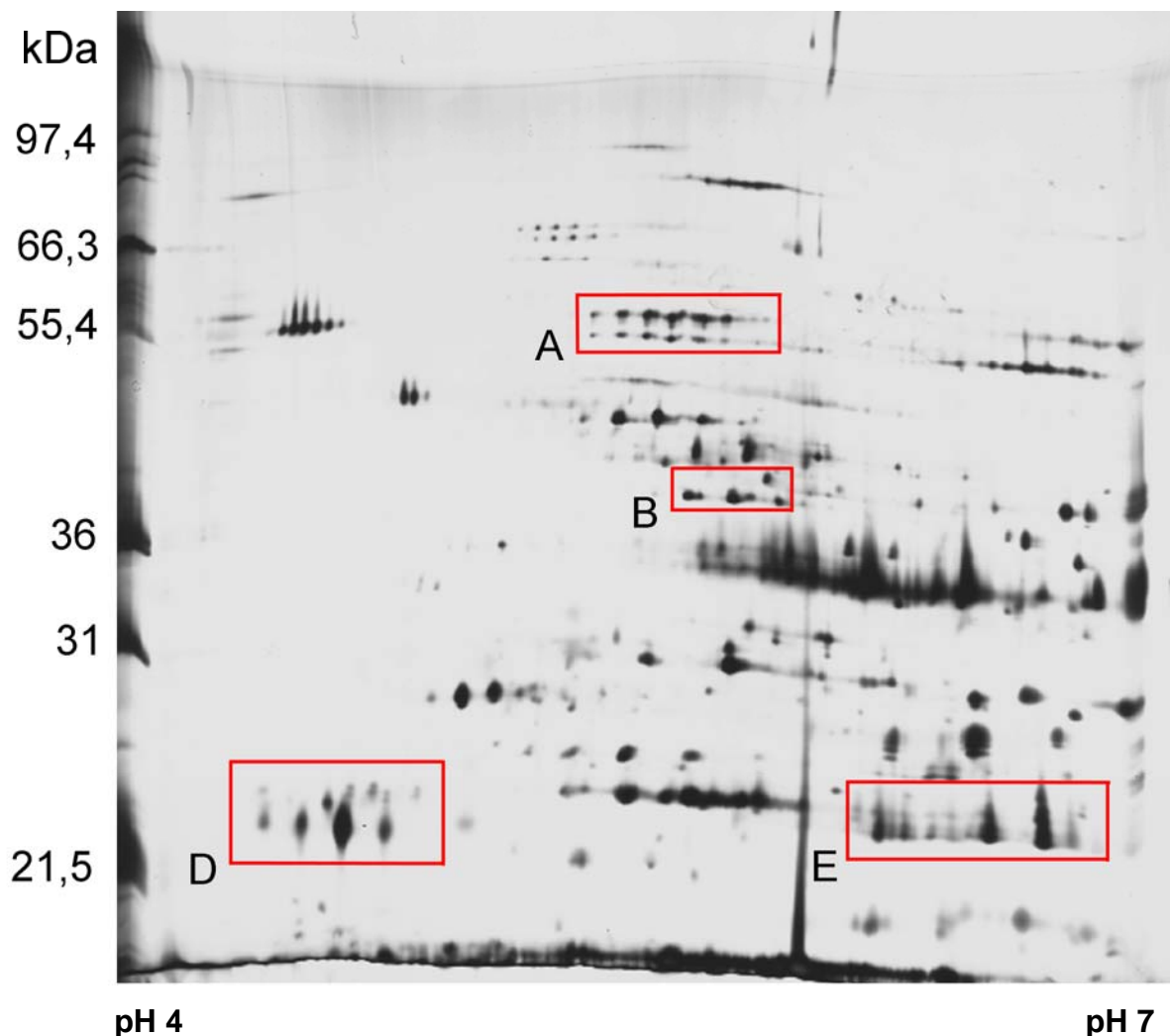


Abb. 21 2D-Elektrophorese von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 48 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 4 und 7 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

Im Fokussierbereich von pH 4-7 ist in Abb. 21 im Vergleich mit Abb. 18 erkennbar, dass die Anzahl an angefärbten Proteinspots von 24 h nach 48 h Bebrütung um

ca. 40 zugenommen hat. Außerdem wird deutlich, dass die Trennung durch isoelektrische Fokussierung und Gelelektrophorese besser erfolgte als bei einem 24 h alten Biofilm mit Bebrütung. Es treten lediglich leichte vertikale Streifen um pH 6,2 auf.

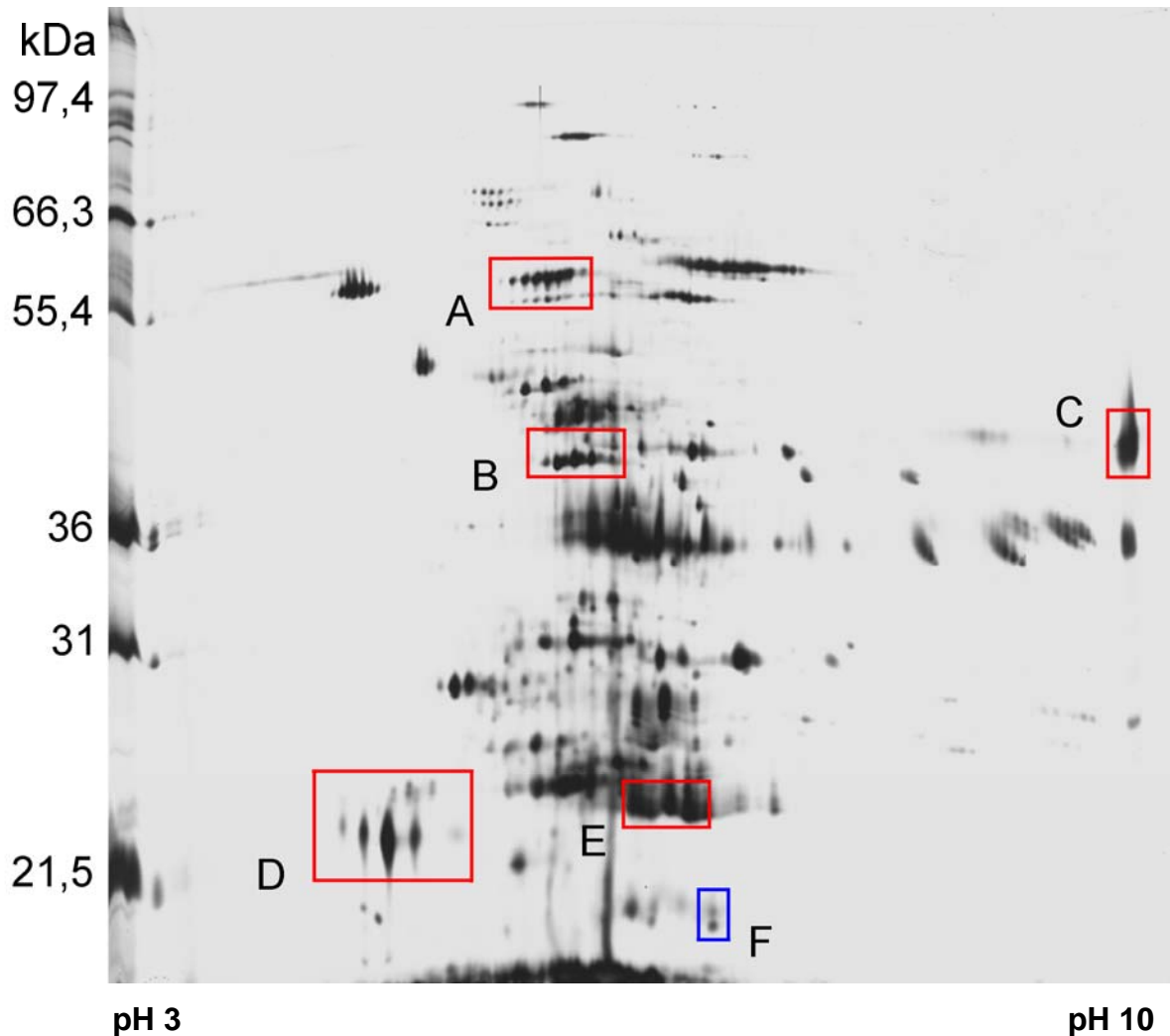


Abb. 22 2D-Elektrophorese von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 72 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 3 und 10 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

Nach 72 h Bebrütungszeit des Biofilms zeigt sich ein weiterer leichter Anstieg der Anzahl der Proteinspots (Abb. 22). Etwa 150 verschiedene Proteinspots sind zu erkennen. Im alkalischen Bereich zeigt sich im markierten Bereich C ein relativ starker Anstieg der Spotintensität gegenüber der eines 48 h alten Biofilms. Im Bereich E zeigen sich langsam Übersättigungseffekte, welche eine genaue

Spotdifferenzierung verhindern, wie in wenigen anderen Teilbereichen des Gels auch.

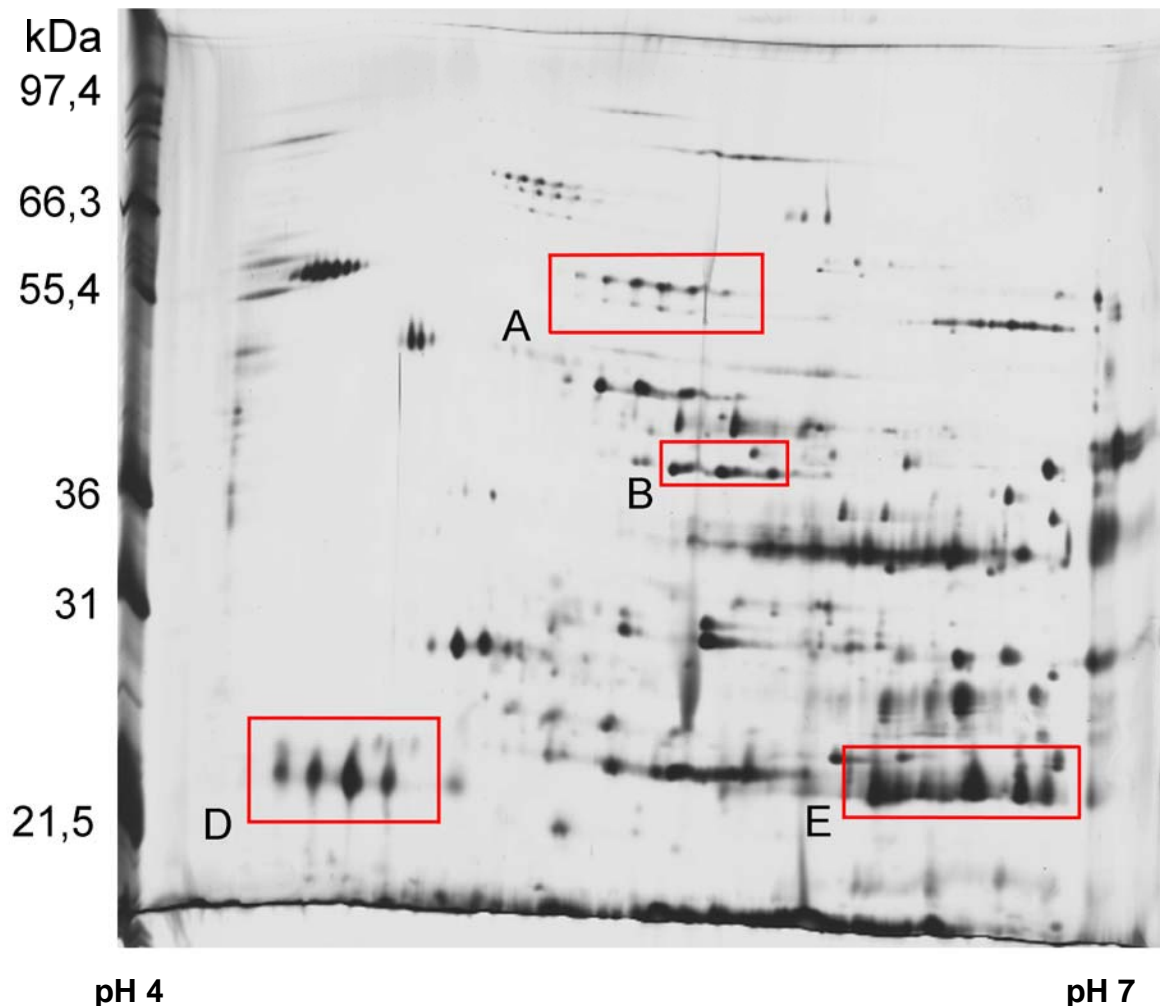


Abb. 23 2D-Elektrophorese von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 72 h. Bei der im pH-Bereich zwischen 4 und 7 fokussierten Probe handelt es sich um 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

Der engere Fokussierbereich zwischen pH 4-7 des in Abb. 23 gezeigten Gels trennt die Proteine in diesem gewählten Bereich genauer auf. Man erkennt darin, dass die Proteinkonzentration des Bereichs A leicht abnimmt, verglichen mit einem Gel eines 48 h alten Biofilms. Die Bereiche B und D sind in ihrer Spotintensität relativ ähnlich geblieben.

In Abb. 24 sind die Bildausschnitte A-F der 2D-Gele nach 24, 48 und 72 h zusammengefasst. Dort erkennt man den Trend zu einer stärkeren Intensitätsentwicklung der Spots innerhalb des ansteigenden Biofilmalters. Im

Bereich A nimmt die Intensität erst stark zu, geht dann wieder leicht zurück, jedoch auf eine Stärke, die weit über dem Ausgangswert liegt. Der Bereich B zeigt ebenfalls einen starken Anstieg der Spotintensität nach 48 h, der Unterschied zu 72 h ist dann jedoch gering. Im Bereich C ist eine durchgehende Intensitätszunahme erkennbar.

Beim Bereich D fällt auf, dass Proteinspots, welche nach 24 Stunden nicht detektierbar sind, nach 48 h eine starke Intensität haben. Nach 72 h ist diese Intensität etwa gleich geblieben, lediglich ein Proteinspot im zentralen Bildausschnitt ist nicht mehr nachweisbar.

Der Bereich E zeigt eine starke Zunahme der Spotintensitäten, bis nach 72 h die Spotunterscheidung durch Übersättigungseffekte der Färbung schwer möglich ist.

Eine Ausnahme in der Entwicklung des Spotprofils bildet der Bereich F. Dort nimmt die Intensität des gefärbten Proteins ab.

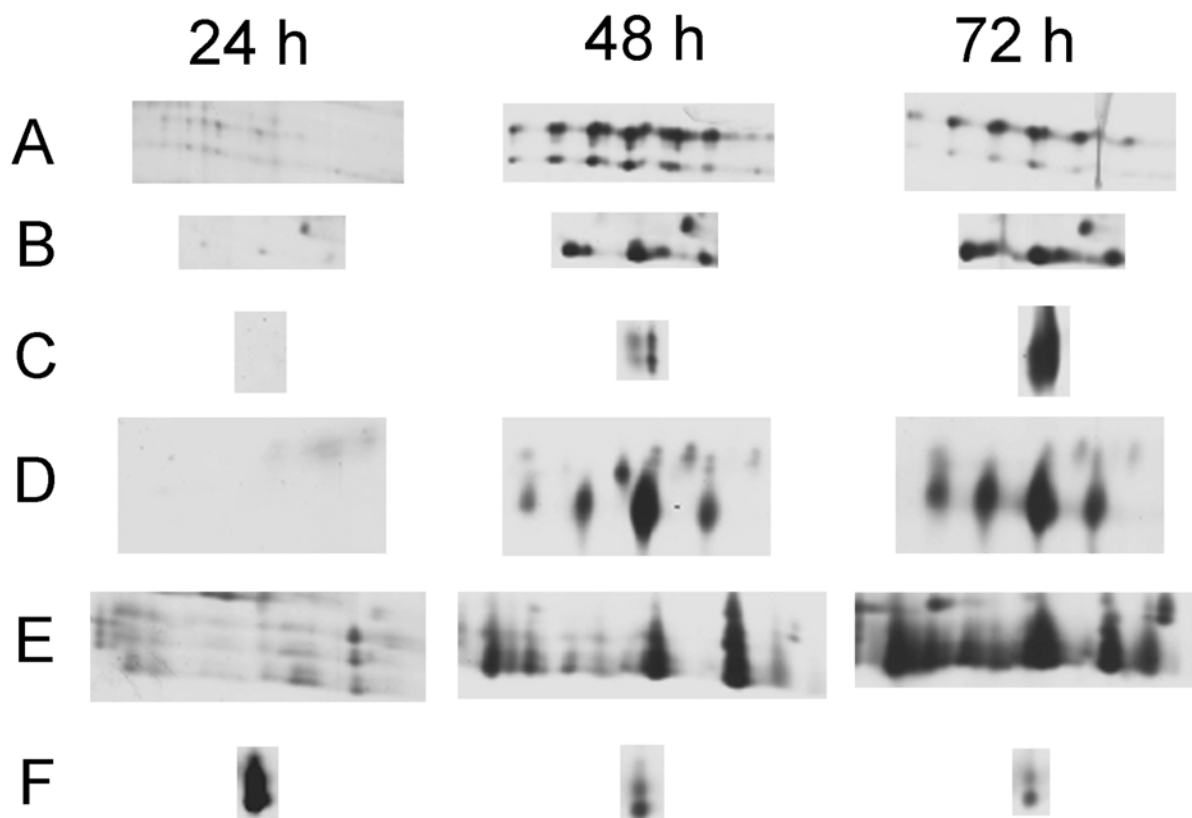


Abb. 24 Vergleich der Bildausschnitte A-F der Abbildungen 16-23 für EPS-Proteine von *P. aeruginosa* SG81 nach 24, 48 und 72 h Bebrütungszeit des Biofilms.

4.10 Proteinidentifikation

Für die massenspektrometrische Identifikation wurden die EPS-Proteine zunächst über die 2D-GE getrennt. Dann wurden die meisten Gele, die zur Identifikation dienen sollten, mit Coomassie-Brillantblau gefärbt, die Proteinspots ausgestochen und die darin enthaltenen Proteine tryptisch zu Peptiden abgebaut. Diese Peptide wurden massenspektrometrisch (MALDI-TOF) analysiert. Ein Flugzeitanalysator (TOF) diente zur Massenbestimmung. Das entstandene Massenspektrum wurde zur Identifizierung der Proteine mit Spektren-Datenbanken verglichen und bei einer Übereinstimmung als Treffer angegeben. Für die Identifikation wurden hauptsächlich solche Spots ausgewählt, welche eine deutliche Intensität durch die Coomassie-Brillantblaufärbung zeigten (siehe Abb. 33).

Ein Teil der Analysen (Spot Nr. 16-21) wurde extern durch den „Protein-Identifikations-Service“ der Firma Protagen (Dortmund) durchgeführt. Dafür wurden die Gele silbergefärbt (Blum et al., 1987), die Analyse wurde dann dort durchgeführt. Das Ergebnis der Datenbankrecherche wurde schließlich mit der Angabe der identifizierten Peptide übermittelt.

Insgesamt wurde die massenspektrometrische Analyse an 86 Proteinspots durchgeführt. Es wurden allerdings nur 21 Proteinspots erfolgreich analysiert. Die restlichen Proben zeigten, vermutlich aufgrund einer zu geringen Proteinmenge, nur unzureichende Massenspektren, die beim Vergleich mit den Datenbanken kein Ergebnis lieferten. Allerdings ist die eindeutige Identifikation bei 6 Proteinspots anhand der massenspektrometrischen Analyse fraglich, da der erzielte Score der Software „GPS-Explorer Workstation“ (Applied Biosystems), der die Übereinstimmung mit einem theoretischen Spektrum angibt, relativ gering ist (<80). Erst durch die zusätzliche Berechnung der theoretischen Masse und des theoretischen isoelektrischen Punkts (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) des von der Datenbank als Treffer angegebenen Proteins wurde die Identifikation dieser Proteine wahrscheinlich, da diese theoretischen Werte mit der Lage im Gel übereinstimmten, mit der Lage von Proteinspots aus der Literatur übereinstimmten und durch mehrfache Analyse unterschiedlicher Proben der gleiche Verdacht erhärtet wurde.

Bei drei Proteinproben erzielte der Datenbankvergleich für die erzeugten Massenspektren zwei wahrscheinliche Proteine. In Tabelle 9 wurden daher dann beide Proteine für den analysierten Proteinspot angegeben.

Die Angabe der zellulären Lokalisation der Proteine erfolgt sowohl anhand theoretischer Berechnungen (www.cbs.dtu.dk) als auch über Berichte in der Literatur. Wenn es dabei zu Unterschieden kam, wurden alle Fundorte angegeben.

In Abb. 25 ist ein 2D-Gel der Proteine der EPS eines 48 h alten Biofilms abgebildet und darin die analysierten Proteinspots eingzeichnet.

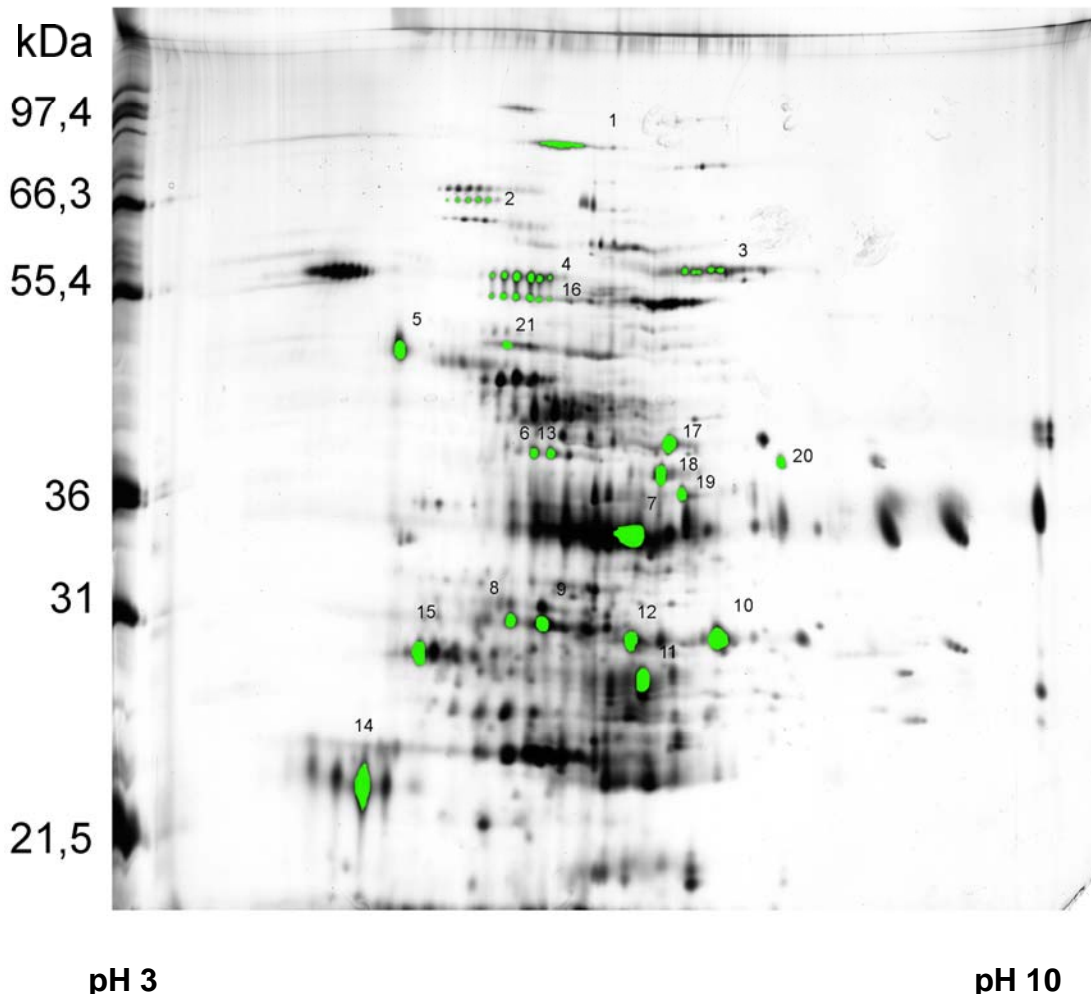


Abb. 25 2D-GE von extrazellulären Proteinen aus einem Biofilm von *P. aeruginosa* SG81 nach Bebrütung bei 36 °C für 48 h. In grün eingzeichnet wurden Bereiche des Gels, welche ausgestochen und mit Trypsin behandelt und deren darin enthaltenen Spaltprodukte massenspektrometrisch analysiert wurden.

4 Ergebnisse

Tabelle 9 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von extrazellulären Proteinen von *P. aeruginosa* SG81, welche wie in Abb. 25 gezeigt elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Abkürzungen der Spalte Lokalisation: C = cytoplasmatisch, P = periplasmatisch, OM = äußere Membran, E = extrazellulär

Spot	Identifiziertes Protein (englische Datenbankbezeichnung)	Score	MW	pI	Lokalisation
1	Malate Synthase G GI 9946344	115	78660,02	5,4	C
2	Hypothetical protein PA3909 GI 9950092	121	83079,37	5,03	E
	COG2374 Extracellular nuclease GI 46164551	111	83222,56	5,00	E
3	Dihydrolipoamide dehydrogenase GI 151345 Gruppe GI 494263 und GI 9947550	135	50150,89	6,48	C
4	Chitinase GI 9948331	98	53042,27	5,22	C / P / E
5	COG3487: Uncharacterized iron-regulated protein GI 46164834	113	46872,31	4,65	OM
	Insulin-cleaving metalloproteinase outer membrane precursor GI 9950599	112	47230,77	4,68	OM
6	Chitinase GI 9948331 Gruppe COG3469 Chitinase GI 53728155	103	53042,27	5,22	C / P / E
7	Chain A Elastase of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> with an Inhibitor GI 52695999	100	33142,59	5,79	E
8	Arginine/ornithine-binding-protein AotJ GI 9946788	68	28009,96	6,43	P / E
9	Arginine/ornithine-binding-protein AotJ GI 9946788	144	28009,96	6,43	P / E
10	Probable TonB-dependent receptor GI 9951841	81	28065,44	7,79	E
11	Thiol: disulfide interchange protein DsbA Precursor GI 4545238	44	23304,02	5,98	P / E
12	COG0673: Predicted dehydrogenases and related proteins GI 53727418	158	26696,39	6,00	E
	Hypothetical protein PA0943 GI 9946848	150	27183,02	7,77	E
13	Chitin-binding Protein CbpD Precursor GI9946749 Gruppe CbpD GI 6466167	76	41916,97	6,38	E
14	COG2885: Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo-)proteins GI 32041851	64	35785,30	4,86	OM
15	Probable periplasmic binding protein GI 9951454	64	27561,45	5,13	P / E
16	Chitinase ChiC [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>] GI 14582406	80	53042,27	5,22	C / P / E
17	Sulfate-binding protein of ABC transporter [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1] GI 9947448	121	36517,36	7,76	E / P
18	COG0252: L-asparaginase/archaeal Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferase subunit D [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2192] GI 84328273	136	374381,71	6,33	P
19	COG2358: TRAP-type uncharacterized transport system, periplasmic component [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14] GI 53726882	64	32004,63	6,20	P
20	Sulfate-binding protein precursor [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1] GI 9946126	124	36433,33	8,45	E
21	Branched-chain amino acid transport protein BraC [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1] GI 9946990	143	39769,34	5,60	P / E

Die Analyse der Proteine ergab, dass die Lokalisation der meisten identifizierten Proteine extrazellulär vorhergesagt wurde, allerdings gelten einige auch als cytoplasmatisch oder periplasmatisch in der Zelle lokalisiert. Die analysierten Proteine entsprechen in der Lage im Gel meist den theoretischen Parametern ihrer Masse und ihres isoelektrischen Punktes. Es wurden also keine stark modifizierten Proteine identifiziert.

4.11 Einfluss von Kalziumionen auf die Expression extrazellulärer Proteine

Der Zusatz von 0,1 mol/l CaCl_2 zum Nährmedium bewirkt eine starke Verfestigung des Biofilms (Govan und Harris, 1986; Körstgens et al., 2001). Es wurde untersucht, ob bei der starken Veränderung der physikalischen Eigenschaften auch eine Änderung der Proteinsekretion auftritt. Bei der nachfolgenden EPS-Gewinnung wurde durch Zusatz von 1 mM EDTA zur physiologischen Kochsalzlösung eine Dispergierung des stark viskosen Biofilms vereinfacht. Die entstandene EPS-Lösung wurde analog zu den Proben behandelt, die aus Biofilmen stammen, welche auf PIA ohne Kalziumzusatz wuchsen. Das entstandene Lyophilisat zeigte bei der isoelektrischen Fokussierung häufig die Tendenz zur unvollständigen Fokussierung bzw. zur Ausbildung von diffusen Proteinspots im Gel. In Abb. 26 wird der Unterschied im Proteinprofil zwischen einem 24 h bebrüteten Biofilm, der auf PIA mit 0,1 M CaCl_2 -Zusatz (Ca-PIA) gewachsen ist und einem ebenso alten Biofilm, gewachsen auf PIA, dargestellt.

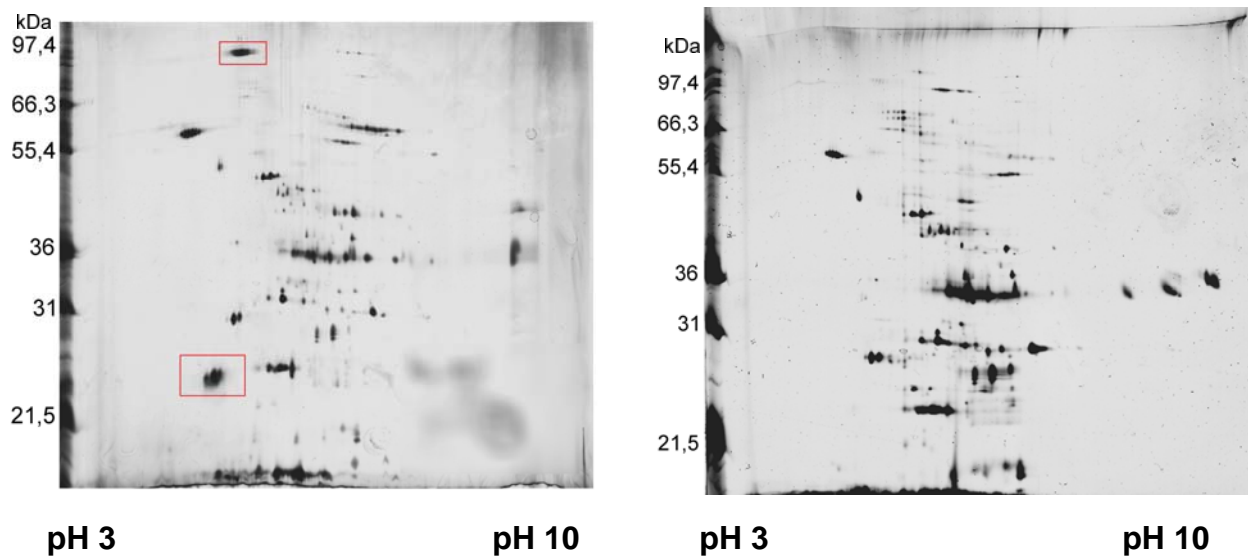


Abb. 26 2D-Gele extrazellulärer Proteine aus Biofilmen von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C. Bei den im pH-Bereich zwischen 3 und 10 fokussierten Proben handelt es sich um je 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration eines auf Ca-PIA gewachsenen Biofilms (links) und auf PIA gewachsenen Biofilms (rechts) mit 24 h Bebrütung.

Es fällt auf, dass die extrazellulären Proteinmuster in großen Bereichen gleich sind, auch wenn Kalzium dem Nährmedium zugesetzt wurde. Als Hauptunterschied der beiden Proteinprofile fällt auf, dass in den in der Abbildung rot markierten Bereichen relativ starke Proteinspots vorhanden sind, die nach Anzucht auf PIA nicht zu detektieren sind. Die Spot-Gruppe bei 22,5 kDa ist bei Anzucht auf PIA erst nach 48 h deutlich zu erkennen, der in Abb. 26 markierte Bereich bei ca. 97 kDa ist bei EPS-Proben, deren Biofilm auf PIA wuchs, nicht nachweisbar.

Im Bereich bei MW = 40 kDa und pI = 8 sind drei relativ stark angefärbte Spots erkennbar, die bei Anzucht auf PIA fehlen. Allerdings fehlen mehrere Spots, bzw. sie sind nur andeutungsweise erkennbar, im Bereich unter 30 kDa sowie im alkalischen Bereich bei 36 kDa.

Beim Vergleich von IPG-Streifen mit pH 4-7 (Abb. 27) fällt deutlicher auf, dass die anfärbbare Proteinmenge unter Kalziumeinfluss geringer ist.

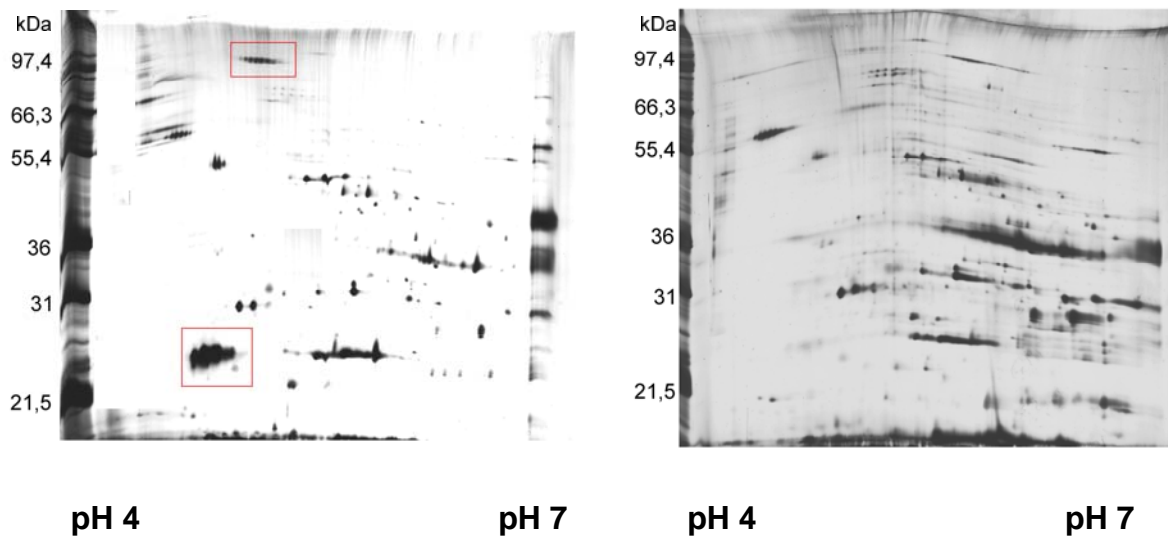


Abb. 27 2D-Gele extrazellulärer Proteine aus Biofilmen von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C. Bei den im pH-Bereich zwischen 4 und 7 fokussierten Proben handelt es sich um je 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration eines auf Ca-PIA gewachsenen Biofilms (links) und auf PIA gewachsenen Biofilms (rechts) mit 24 h Biofilmalter.

Obwohl der Rest der Proteinspots recht scharf fokussiert wurde, ist im markierten Bereich bei 22,5 kDa keine scharfe Fokussierung erfolgt, auch bei längerer Fokussierdauer gelang dies nicht (Gele nicht gezeigt).

4.11.1 Entwicklung innerhalb von 72 h

Bei Anzucht der Biofilme über 48 h und 72 h nimmt die Menge des anfärbbaren Proteins nach 48 h weiter leicht ab. Das Proteinprofil selbst ist innerhalb der gewählten Bebrütungszeit nur geringen Änderungen unterworfen. Wie in Abb. 28 erkennbar, sind bei 48 h Bebrütung mehrere Proteinspots im sauren pI-Bereich erkennbar, welche bei 72 h Bebrütung nicht mehr nachweisbar sind. Das sind unter anderem die Spots bei MW = ca. 55 kDa und pI = 4,2 und der Spot bei ca. 95 kDa und pI = 4. Die vier Streifen im linken Bildbereich der Abbildung sind durch Proteinmarker hervorgerufen, welche bei der Agarosefixierung des IPG-Streifens auf dem SDS-Gel in den Bereich des Gels diffundierten. Sie sind aber anhand ihrer Lage links am Gelrand und der entsprechenden Markerbande eindeutig als Kontamination erkennbar, es wurde kein Proteinspot überdeckt. Im rechten Bereich der Gele sind unfokussierte Proteine mit alkalischem pI zu erkennen.

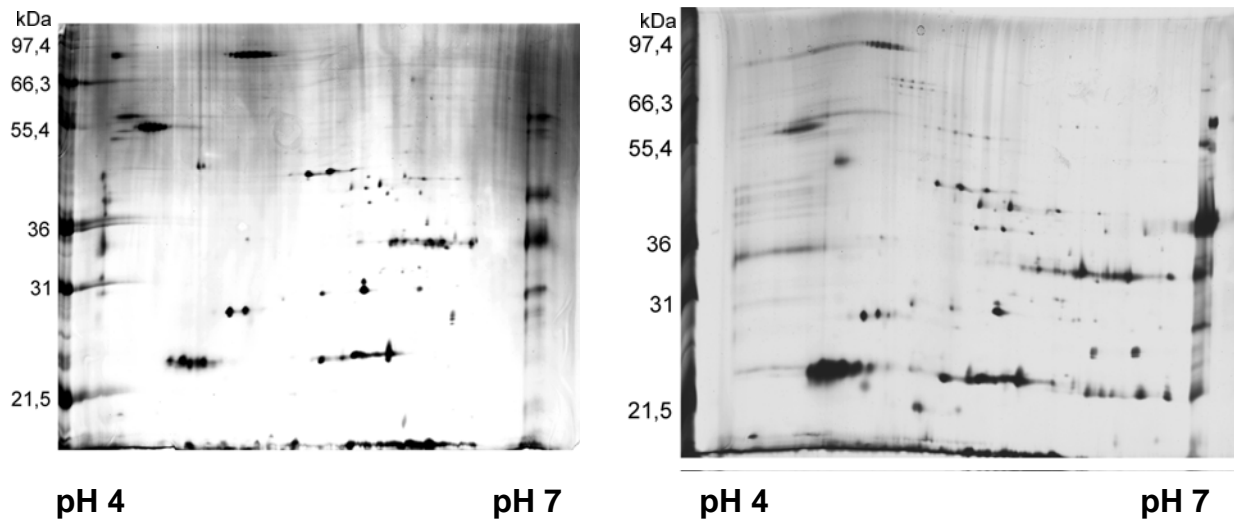


Abb. 28 2D-Gele extrazellulärer Proteine von auf Ca-PIA gewachsenen Biofilmen von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C mit 48 h (links) und 72 h (rechts) Biofilmalter. Es wurde jeweils ein IPG-Streifen des Bereichs pH 4-7 verwendet. Es handelt sich um je 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

Bei der Verwendung von IPG-Streifen des Bereichs 3-10 ist, wie in Abb. 29 gezeigt wird, die Anfärbung der Proteine bei 48 h am geringsten. Einige bei $pI = 4-7$ erkennbare Proteinspots wurden gar nicht angefärbt, andere nur sehr gering.

Bei 72 h Bebrütung fällt im alkalischen pI -Bereich von über 10 eine große Menge Protein auf, welche mit den zur Verfügung stehenden Fokussierbereichen der IPG-Streifen nicht scharf fokussiert werden kann.

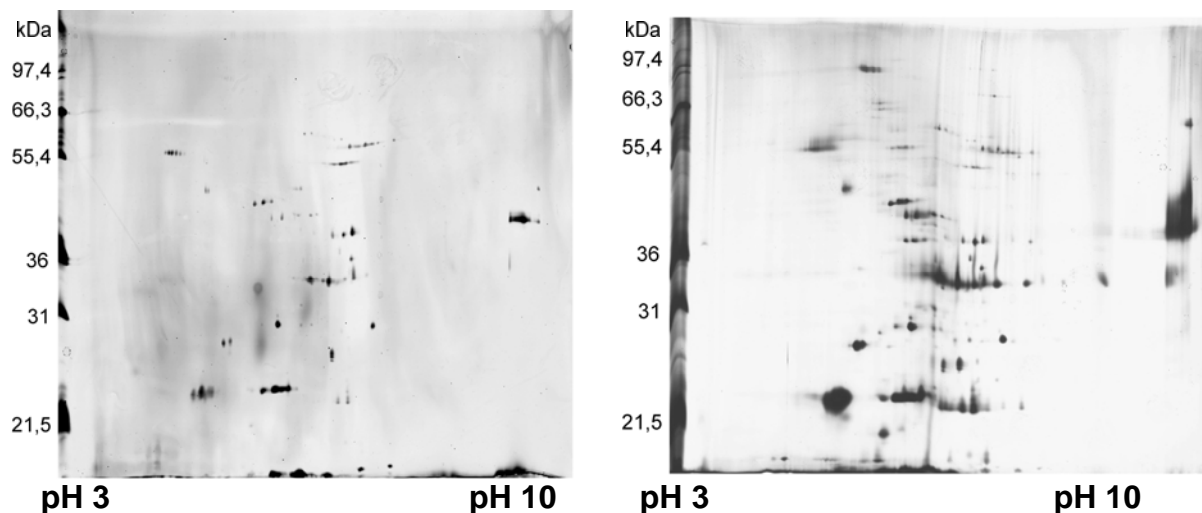


Abb. 29 2D-Gele extrazellulärer Proteine von auf Ca-PIA gewachsenen Biofilmen von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C mit 48 h (links) und 72 h (rechts) Biofilmalter. Es wurde jeweils ein IPG-Streifen des Bereichs pH 3-10 verwendet. Es handelt sich um je 2,5 mg Lyophilisat von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration.

5 Diskussion

5.1 Allgemeines

Zum Verständnis des Phänomens Biofilm ist die Untersuchung der Komponenten, die diesen Biofilm bilden, wesentlich. Erst dadurch können physikalische, biologische und medizinische Zusammenhänge erklärt, Abläufe gedeutet und Lösungen von biofilmbedingten Problemen gefunden werden. Obwohl heute viele Methoden eingesetzt werden, Biofilme zu charakterisieren (Denkhaus et al., 2007), ist die Identifizierung der Einzelkomponenten dabei immer von großer Hilfe. Bis heute sind grundlegende Fragestellungen, wie z. B. der molekulare Aufbau der EPS von Biofilmen, weitgehend ungeklärt. Dabei sind es gerade diese Makromoleküle, die den Bakterien das Leben in der Umwelt vereinfachen bzw. es erst ermöglichen.

Bei dem Bakterium *P. aeruginosa*, welches in der Biofilmforschung als Modellorganismus gilt, ist die Untersuchung und Beschreibung von biologischen Phänomenen weit gediehen. Auf dieser Basis wird versucht, allgemeingültige Rückschlüsse, bakterielle Biofilme betreffend, zu finden.

Dabei werden erst seit jüngerer Zeit auch die Grenzen der Untersuchung eines solchen Modellorganismus und der dadurch angestrebten Verallgemeinerung von Prozessen erkannt. Denn häufig verwenden verschiedene Organismen unterschiedliche Strategien bei der Problemlösung mit ihrer Umwelt. Dies bedeutet, dass z. B. spezielle Wirkstoffe, welche die Biofilmbildung bei einem bestimmten Bakterienstamm beeinflussen, bei anderen Stämmen oder Bakteriengattungen keine oder andere Effekte haben.

Um eventuelle Ansatzpunkte bei der Behandlung bakterieller Biofilme zu erhalten, ist es zumindest hilfreich, einen Überblick über den molekularen Aufbau eines Biofilms zu erlangen. Für den nichtmucoiden Bakterienstamm *P. aeruginosa* PAO1 können die extrazellulären Proteine in einer Flüssigkultur und teilweise auch im Biofilm analysiert und identifiziert werden. Da zur Identifikation der extrazellulären Proteine mucoider Bakterienstämme bis jetzt noch keine Methode existiert, war es ein Ziel dieser Arbeit, ein Protokoll zu entwickeln, welches es erlaubt, die extrazellulären Proteine des mucoiden, aus der Umwelt isolierten Bakterienstamms *P. aeruginosa* SG81 zu analysieren. Dadurch wird ein Ansatz geliefert, der es später eventuell ermöglichen kann, diese spezielle Methode für die Analyse extrazellulärer Proteine anderer Bakterienarten zu adaptieren. Durch Untersuchungen ihrer

Proteinsekretionsprofile würden sich so eventuell Möglichkeiten ergeben, Strategien zu entwickeln, biofilmbürtige Probleme in Natur, Medizin und Technik zu lösen.

5.2 Biochemische Zusammensetzung der EPS

Die biochemische Analyse der EPS ungesättigter, also auf einer Agaroberfläche gewachsener Biofilme von *P. aeruginosa* SG81 ergibt, dass Proteine eine bedeutende Stoffgruppe in der extrazellulären Matrix darstellen. Innerhalb von 72 h zeigte sich innerhalb der natürlichen Streuung ein sehr leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg in der Konzentration. Diese Schwankungen sind ein natürliches Phänomen, welches bei der Deutung von Analysen biologischer Systeme eine besondere Beachtung erfordert.

Der Uronsäuregehalt, welcher mengenmäßig in den EPS dominiert, ist innerhalb von 72 h leicht rückläufig. Dies kann ein Hinweis auf die Anwesenheit einer Alginat-Lyase sein. Bei *P. aeruginosa* ist eine periplasmatisch lokalisierte Alginat-Lyase, AlgL, nachgewiesen worden, welche mannuronatspezifisch spaltend wirkt (Nguyen und Schiller, 1989).

Da bei der zeitlichen Entwicklung der Kohlenhydratgehalt konstant bleibt, müssen in den EPS auch andere Kohlenhydrate enthalten sein, welche nicht zu den Uronsäuren gehören. Dieses Phänomen der neutralen Polysaccharide in den EPS von *P. aeruginosa* ist auch von Marty et al. (1992) und Rode (2004) beschrieben worden, sowie von Allison (1993), wo von einem Polysaccharid berichtet wurde, welches die Anheftung von Zellen verbessert.

Die Beobachtung, dass ein Teil der Kohlenhydrate und Proteine durch Dialyse entfernbar ist, lässt vermuten, dass diese Moleküle geringerer Größe entweder durch den Abbau großer Moleküle entstanden sind, oder aber, dass die Zelle auch diese kleinen Moleküle sekretiert. Die Ausschlussgröße der verwendeten Dialysemembran wurde so gewählt, dass möglichst alle Moleküle, die kleiner als das kleinste darstellbare Protein im gewählten Gelelektrophoresesystem dieser Arbeit (ca. 15 kDa) sind, entfernt werden.

5.3 1D-Gelelektrophorese der extrazellulären Proteine

Bei der eindimensionalen gelelektrophoretischen Charakterisierung der Proteine konnten mit Silberfärbung ca. 30 unterschiedlich stark gefärbte Proteinbanden

detektiert werden. Dies kann einerseits bedeuten, dass diese Proteine in unterschiedlich großen Konzentrationen extrazellulär vorliegen, auf der anderen Seite können sich hinter einer einzelnen Proteinbande auch mehrere verschiedene Proteine verbergen, welche eine ähnliche Molekülgröße besitzen, aber unter den gewählten Elektrophoresebedingungen nicht aufzulösen sind. Die Trennung solcher Proteine ist mit Methoden, die eine feinere Auflösung zeigen, möglich. Beispielsweise gelingt dies, wenn die Moleküle vorher anhand ihrer Ladung getrennt werden, wie bei der isoelektrischen Fokussierung.

Die Coomassiefärbung als weitverbreitete Visualisierungsmethode ist bei der Analyse der Lösungen von EPS-Proteinen mit der verwendeten Isolationsmethode nur wenig erfolgreich. Der Proteingehalt der Lösungen ist recht gering. Die Silberfärbung ist sensitiver und färbt auch geringe Proteinmengen an. Durch Gefriertrocknung aufkonzentrierte Lösungen sind elektrophoretisch schlecht zu trennen (Gele nicht gezeigt). Vermutlich bilden sich durch das Entwässern Protein-Kohlenhydrat-Addukte, welche in der Elektrophorese störend wirken und sich durch Rehydratation nur schwer lösen lassen. Deshalb lassen sich mit der eindimensionalen Gelelektrophorese nur native EPS-Lösungen analysieren.

In früheren Untersuchungen konnte mit photometrischen Testverfahren eine proteolytische Aktivität in EPS-Lösungen nachgewiesen werden (Broekman, 2000; Tielen 2005). Bei der Verwendung von Zymogrammgele mit Gelatine als Substrat konnten zwei extrazelluläre proteolytisch aktive Enzyme nachgewiesen und näher charakterisiert werden. Ihnen konnten apparente molare Massen von 54 sowie etwa 125 kDa zugeordnet werden. Caballero et al. (2001) beschrieb mit diesem Testsystem ähnliche Proteasen, die als alkalische Protease (56 kDa) und Elastase (B) (160 kDa) identifiziert wurden. Die Größenunterschiede bei der vermuteten Elastase zu den Literaturwerten sind dadurch zu erklären, dass diese Bande recht groß und diffus im Zymogramm-Gel erschien (siehe Abb. 9). Elastase ist die aktivste Protease von *P. aeruginosa* und zeigt eine etwa zehnfach höhere Aktivität als die alkalische Protease (Galloway, 2001). Bei der Entwicklung des Gels (nach dem elektrophoretischen Lauf und der Renaturierung) kann deshalb auch schon durch geringe Diffusion der Protease eine große entfärbte Bande erzeugt werden.

Nach dem Nachweis der Existenz zumindest zweier aktiver, proteolytisch wirkender Enzyme wurde der Proteaseinhibitor Pefabloc bei der EPS-Isolierung direkt nach Abtrennung der Zellen zur Lösung hinzugefügt, damit ein möglichst von Proteasen

unbeeinflusstes, authentisches Bild der Proteinzusammensetzung innerhalb des extrazellulären Raums des Biofilms gewonnen werden konnte. Da diese Enzyme auch schon während des Wachstums des Biofilms extrazelluläre Proteine abbauen, ist allerdings davon auszugehen, dass trotz des Einsatzes dieses Hemmstoffes enzymatische Abbauprodukte der Proteine im Biofilm nachweisbar sind. Ohne diesen Zusatz bestände die Gefahr, dass einige im natürlichen Biofilm vorhandene Proteine nach der Isolierung der EPS enzymatisch zumindest teilweise abgebaut werden, was ihre massenspektrometrische Identifikation erschweren würde.

5.4 2D-GE-Versuche mit nativer EPS-Lösung

Der Versuch, die Proteine der „nativen“, also nur von den Zellen abgetrennten, EPS in wässriger Lösung mit Hilfe der 2D-GE weiter aufzutrennen, schlug allerdings fehl. Die Probleme der Auftrennung müssen bei der isoelektrischen Fokussierung auftreten, denn die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe ist eindimensional erfolgreich gewesen. Da die Kohlenhydratkonzentration in den EPS doppelt so hoch ist wie die Proteinkonzentration, ist es am wahrscheinlichsten, dass geladene Kohlenhydrate für die Probleme bei der Fokussierung verantwortlich waren. Auf der einen Seite verstopfen große Makromoleküle die Poren des Gels innerhalb des IPG-Streifens. Auf der anderen Seite handelt es sich bei dem in den EPS hauptsächlich vorkommenden Polysaccharid Alginat um ein Polyelektrolyt. Elektrolyte, als geladene Moleküle, wandern im elektrischen Feld. Folglich werden wahrscheinlich hauptsächlich die Alginatmoleküle bei der IEF fokussiert. Wenn diese sich dann im IPG-Streifen bewegen bzw. an der Stelle ihres isoelektrischen Punkts akkumulieren, ist eine Wanderung der Proteine durch diesen Bereich nicht mehr möglich, da die Poren des IPG-Gels verstopft sind. Dadurch kann das Phänomen erklärt werden, dass bei manchen unvollständig fokussierten IPG-Streifen teilweise einige Proteinspots fokussiert werden, andere Bereiche jedoch nicht (siehe Abbildung 30).

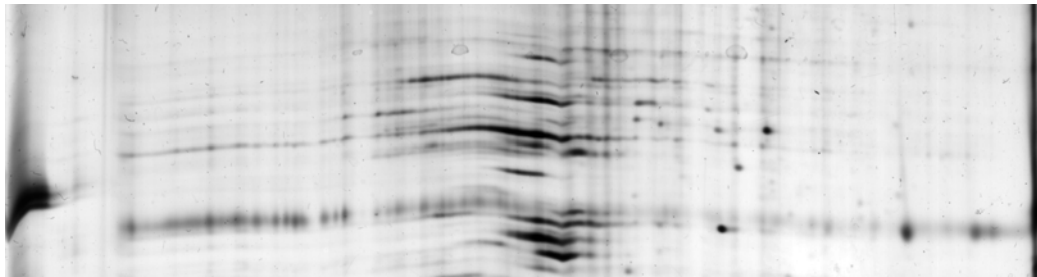


Abb. 30 Ausschnitt eines 2D-Gels mit einer unvollständigen IEF. Im rechten Bereich gelang es Proteine isoelektrisch zu fokussieren, im mittleren und linken Bereich ist die Fokussierung unvollständig.

Die Abtrennung des störenden Kohlenhydratanteils ist deshalb im Fall der Proteinanalytik der EPS aus Biofilmen des mucoiden Stamms *P. aeruginosa* unumgänglich.

5.4.1 Abtrennung der Kohlenhydrate durch Fällung

5.4.1.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Um die Proteine von den Kohlenhydraten zu trennen, wurde die weit verbreitete Methode der Fällung auch extrazellulärer Proteine (z. B. Nouwens et al., 2002; Sauer et al., 2002) durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) angewendet. Anders als erwartet, bildete sich jedoch bei EPS-Lösungen von *P. aeruginosa* SG81 kein Präzipitat. Selbst über einen großen Konzentrationsbereich hinweg war keine Ausfällung der Proteine durch Zugabe von TCA zu beobachten. Dieses Phänomen ist nicht ganz einfach zu erklären. Sivaraman et al. (1997) beschrieben in der Untersuchung des Prozesses der Proteinfällung durch TCA folgenden Zusammenhang: Innerhalb des Proteins findet, bei Anwesenheit eines bestimmten Konzentrationsbereichs an TCA in der Proteinlösung, eine Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins statt. Dabei werden hydrophobe Bereiche im Molekülinneren nach außen verlagert und diese hydrophoben Bereiche wechselwirken intermolekular miteinander und sorgen so für eine Ausfällung des Proteins.

Warum die Proteine in der EPS-Lösung nach TCA-Zusatz nicht ausfallen, ist noch ungeklärt. Eine mögliche Ursache besteht darin, dass die Proteine durch Wechselwirkung mit den Polysacchariden oder anderen EPS-Bestandteilen derart geschützt sind, dass eine Umfaltung (Denaturierung) durch die Anwesenheit von

TCA erschwert wird. Diese Schutzwirkung von Alginat auf extrazelluläre Proteine wird ebenfalls durch die Beobachtungen von Wingender et al. (1987) und Tielen (2005) gestützt, dass Alginat die thermische Inaktivierung des extrazellulären Enzyms Lipase erschwert. Eine wässrige Lösung mit Lipase von *P. aeruginosa* verliert ihre Aktivität erst durch Erhitzen auf höhere Temperaturen, wenn Alginat in der Lösung anwesend ist, verglichen mit Lösungen des Proteins ohne dieses Polysaccharid. Eine Denaturierung (Umfaltung) der Proteine findet also erst bei drastischeren Bedingungen statt, wenn Alginat anwesend ist.

5.4.1.2 Fällung des Alginats durch Ca^{2+} -Ionen

Beim Zusatz von Kalziumionen zur EPS-Lösung reagieren diese zu einer schwerlöslichen Verbindung (Kalziumalginate), welches sich durch Zentrifugation abtrennen lässt. Dieses Präzipitat ist sehr voluminös und nahm ca. 80 % des Volumens der ursprünglichen EPS-Lösung ein. Es gelang dadurch, die Konzentration des Alginats im Überstand zu vermindern. Eine IEF der Proteine war hinterher jedoch trotzdem nicht reproduzierbar durchzuführen. Einerseits erschweren noch vorhandene Kohlenhydrate, welche nicht gefälltes Alginat oder keine Alginat sind, die Fokussierung. Auf der anderen Seite ist eine Bindung des Kalziums an die Proteine denkbar. Dadurch würde sich deren isoelektrischer Punkt verschieben. Je nach Einwirkungszeit der Kalziumionen war tatsächlich eine leichte Verschiebung innerhalb des Proteinprofils erkennbar (Gele nicht gezeigt).

Die anschließende Dialyse war wahrscheinlich nicht ausreichend, um diese Ionen vollständig aus der Lösung zu entfernen, die starken Wechselwirkungen zwischen Kalziumionen und bakteriellen Alginaten beschrieben Lattner et al. (2003). Eine Reproduktion des Proteinprofils durch 2D-GE war mit Lösungen, die mit Kalziumchlorid versetzt wurden, nicht möglich.

5.4.1.3 Säulenchromatographie (Gelfiltration)

Die säulenchromatographische Untersuchung der EPS diente sowohl der weitergehenden biochemischen Charakterisierung als auch der präparativen Trennung von Kohlenhydraten und Proteinen.

Es zeigte sich, dass die Kohlenhydrate eine weite Größeverteilung haben. Wie bereits von Rode (2004) beschrieben, sind extrazellulär außer dem Alginat auch

noch andere Kohlenhydrate vorhanden. Einerseits ist diese dadurch zu erkennen, dass der Konzentrationsverlauf der Kohlenhydrate über einen weiteren Bereich geht, als der Uronsäureverlauf. Auf der anderen Seite hat gereinigtes Alginat von *P. aeruginosa* SG81 eine mittlere Molekülgröße von etwa 1000 kDa (Straatmann und Borchard, 2002; Windhues und Borchard 2003) und würde trotz seiner Polydispersität über einen schmalen Peak eluieren. Eine Anwesenheit von anderen Polysacchariden verbreitert den Elutionspeak dabei. Eine Wechselwirkung von Alginat mit anderen EPS-Bestandteilen ist auch möglich und würde sich im Elutionsdiagramm durch sogenanntes Tailing, also einer Verschiebung zu späteren Fraktionen bemerkbar machen.

Dass die Proteine über einen weiten Bereich eluieren ist neben der gelelektrophoretischen Identifikation ein weiterer Hinweis darauf, dass eine Vielzahl an Proteinen unterschiedlicher Größe in den EPS vorhanden sind. Dieser Effekt kann allerdings auch durch eine Bildung von Protein-Kohlenhydratkomplexen verstärkt werden, welche dann zusammen eluieren.

5.4.1.4 Störung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten durch Argininzusatz

Molecular-Modelling-Untersuchungen von Alginat mit dem Enzym Lipase von *P. aeruginosa* wurden im Vakuum und in einer Wasser-Box durchgeführt. Es ergaben sich dabei Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen den an der Oberfläche des hydrophilen Bereichs des Enzyms befindlichen, positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Histidin und dem Alginat (Tielen et al., in Vorbereitung). Eine Anlagerung des Enzyms an Alginat mit diesen Seitenketten ist energetisch vorteilhaft, eine Darstellung dieses modellierten Komplexes ist in Abb. 31 zu sehen.

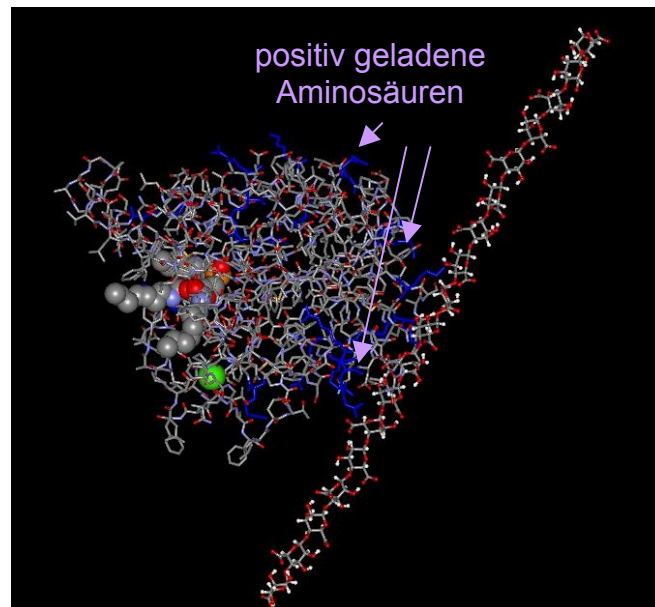


Abb. 31 Modellberechnung des Energieminimums zwischen Alginat und der Lipase LipA von *P. aeruginosa*. Die Lipase ist mit einem Inhibitormolekül im aktiven Zentrum dargestellt. Positiv geladene Aminosäurereste des Enzyms sind blau dargestellt (Tielen et al., in Vorbereitung).

Wenn die potentiellen Bindungsstellen des Alginats durch den Zusatz von Arginin zur EPS-Lösung abgesättigt werden, könnten die Wechselwirkungen zwischen Alginat und Protein mit einer kompetitiven Bindungsreaktion geschwächt werden.

Im Elutionsdiagramm macht sich der Argininzusatz zur EPS-Lösung dadurch bemerkbar, dass die Proteine erst etwas später, dafür allerdings in leicht höherer Konzentration nachgewiesen werden können. Proteine, die also vorher schon mit Kohlenhydraten als Komplex bei früheren Fraktionen zusammen eluierten, sind nun erst später nachzuweisen. Es zeigt sich dadurch eine Verbesserung des Trennergebnisses. Diese Beobachtung führte zu der Veränderung im EPS-Isolierungsprotokoll in der Art, dass nun immer ein Zusatz von 3 mg Arginin pro ml EPS-Lösung stattfand. Diese Konzentration ist so gewählt, dass Arginin im Überschuss vorliegt und alle potentiellen Bindungsstellen mit Arginin abgesättigt werden können.

2D-GE-Untersuchungen verschiedener vereinigter Fraktionen, welche einen hohen Protein- und nur recht geringen Kohlenhydratgehalt besaßen, waren wahrscheinlich deshalb nicht erfolgreich, weil sie einen immer noch zu hohen Restgehalt an Polysacchariden vorwiesen.

Das eingesetzte Gelmaterial Sephacryl S-200 HR zeigte keine deutliche Verbesserung der Trennung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen im Vergleich

zu Sephacryl S-500 HR. Die Proteine wurden lediglich in einem größeren Bereich von der Säule eluiert, erstaunlicherweise war dies erst zu einem recht späten Zeitpunkt der Fall. Dieser späte Elutionsbereich entspricht einer Molekülgröße von unter 40 kDa bei Kalibration der Trennsäule mit Kalibrationsproteinen. Es scheint also hier wiederum zu Wechselwirkungen zu kommen, die eine Verschiebung des Elutionspeaks hervorrufen.

Auch die durch den Wechsel des Trennmaterials modifizierte säulenchromatographische Trennung reichte immer noch nicht aus, um durch die Vereinigung proteinreicher Fraktionen Probenmaterial zu erhalten, welches erfolgreich einer 2D-GE-Untersuchung unterzogen werden konnte. Durch Coelution von Kohlenhydraten und Proteinen kam es immer dazu, dass im gewonnenen Probenmaterial zu viel Kohlenhydrat enthalten war um eine isoelektrische Fokussierung erfolgreich durchzuführen.

5.4.1.5 Enzymatischer Abbau des Alginats durch Alginat-Lyase

Die Charakterisierung verschiedener Alginat-Lyasen ergab, dass sich die kommerzielle Alginat-Lyase des *Flavobacterium*s wahrscheinlich am besten für die Spaltung bakterieller Alginate eignet, da sie die höchste Aktivität der untersuchten Enzyme für bakterielles Alginat als Substrat besitzt. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen gelang zwar ein teilweiser enzymatischer Abbau, jedoch gelang es anschließend nicht, den Uronsäuregehalt der EPS-Lösung durch Dialyse gegen A. deion. ausreichend stark zu senken. Entweder war der Abbau des Alginats nur so unzureichend, dass hauptsächlich Bruchstücke entstanden, welche eine molare Masse von über 16 kDa hatten, oder aber die entstandenen Bruchstücke waren mit den Proteinen assoziiert und diese Addukte waren dann durch Dialyse nicht zu trennen. Beide Hypothesen würden die anschließende unvollständige IEF erklären. Die Proteine trugen immer noch geladene Oligosaccharide mit sich, welche bei der Fokussierung stören.

Es gelang mit keiner der angegebenen Alginat-Lyasen eine Probenvorbereitung, die eine Proteinanalyse mittels 2D-GE ermöglichte.

Alginat ist ein Polymer, welches aus β -D-Mannuronat und α -L-Guluronat besteht, welche im Makromolekül in unterschiedlicher Reihenfolge angeordnet sind. Es können homopolymere Bereiche eines Monomers vorkommen sowie heteropolymere Bereiche, in denen die Monomere abwechselnd vorliegen. Die Alginat-Lyasen von *K.*

aerogenes und *Cytophaga* sp. sind hauptsächlich Guluronat-spezifisch, von dem kommerziellen Enzym ist keine Spezifität angegeben. NMR-Untersuchungen von Schürks et al. (2002) ergaben allerdings, dass es sich bei dem von *P. aeruginosa* SG81 synthetisierten Bakterienalginat um ein Alginat handelt, in dem keine G-Blöcke, also Bereiche in der Polymerkette, die aus mehreren Guluronatmonomeren hintereinander bestehen, vorkommen. Dies kann auch als Erklärung dafür dienen, dass es nicht zu einem vollständigen Abbau des Alginats kam, da nicht genügend geeignete potentielle Schnittstellen am Substratmolekül vorhanden sind.

Das Alginat von *P. aeruginosa* SG81 ist teilweise acetyliert (Grobe et al., 1995). Skjåk-Bræk et al. (1985) und Lange et al. (1989) fanden eine Schutzwirkung O-acetylierter bakterieller Alginat gegenüber den enzymatischen Abbau durch Alginat-Lyasen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den unvollständigen Abbau des Alginats in den EPS durch den Zusatz einer Alginat-Lyase.

5.4.1.6 Trennung durch Rückhaltung der Polysaccharide bei der Ultrafiltration

Durch Ultrafiltration wurde versucht, die starken Größenunterschiede zwischen Alginat und Proteinen auszunutzen. Über die eindimensionale Gelelektrophorese wurde die Größe der EPS-Proteine auf maximal 98 kDa bestimmt. Es wurde daher eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Porengröße gewählt, welche zwar alle Proteine, jedoch möglichst kein Alginat durchlassen sollte, dessen Molekülgröße mit verschiedenen Methoden auf 1000 kDa bestimmt wurde (Straatmann und Borchard, 2002; Windhues und Borchard, 2003). Die Analyse des Filtrats und des Retentats ergab jedoch, dass ein Großteil der Kohlenhydrate die Filtrationsmembran passieren konnte. Dies lässt sich wohl dadurch erklären, dass sich ein langes gelöstes Polyelektrolytmolekül bei hoher Ionenstärke in Knäuelform anordnet. Mayer et al. (1999) beschrieben diesen Zusammenhang am Beispiel der Polyacrylsäure. Diese Modellsubstanz für Biopolymere wie Alginat zeigt bei zunehmender Ionenstärke eine Veränderung ihres Ionenradius in der Art, dass bei einem langgestreckten Molekül eine Reduktion des Ionenradius stattfindet, wahrscheinlich unter Bildung einer Knäuelstruktur (siehe Abb. 32).

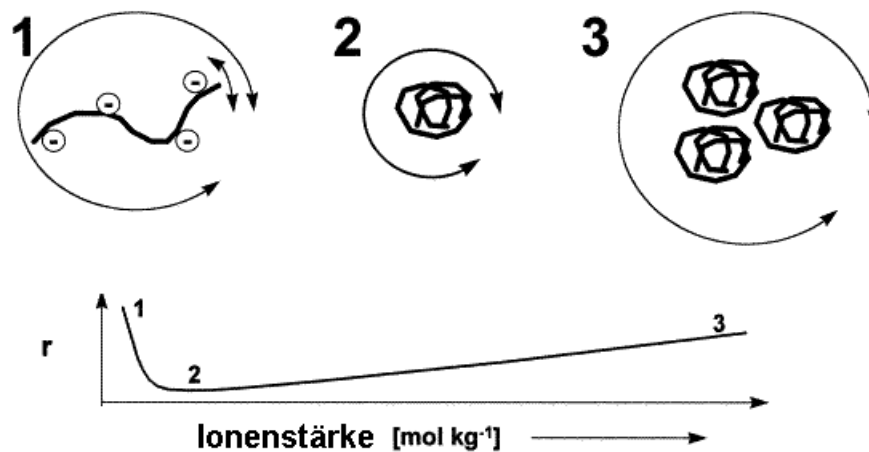


Abb. 32 Schematische Darstellung der Abhängigkeit des Ionenradius von Polyacrylsäure in wässriger Lösung unterschiedlicher Ionenstärke (nach Mayer et al. 1999).

Dadurch erklärt sich der Durchtritt des Alginats durch die Ultrafiltrationsmembran einer nominell geringeren Porengröße, da die EPS-Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung (0,14 M) hergestellt wird. Durch Absenkung der Ionenstärke der EPS-Lösung durch Dialyse gegen A. deion gelang es, die Trennleistung der Ultrafiltration zu erhöhen, d. h. Alginat wird dabei durch die Membran zurückgehalten, die Proteine passieren die Membran. Dies ist wahrscheinlich auf die Erhöhung des Ionenradius des Alginats zurückzuführen. Die geringfügige Verminderung der Proteinkonzentration kommt wahrscheinlich einerseits daher, dass die Porengröße der Ultrafiltrationsmembran nur nominell 100 kDa beträgt, auf der anderen Seite sind wahrscheinlich nicht alle intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Alginat und Proteinen durch Argininzusatz aufgehoben worden und vorhandene Addukte dadurch im Retentat verblieben.

5.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese extrazellulärer Proteine von *P. aeruginosa* in der Literatur

Im Allgemeinen ist festzustellen, dass die erfolgreiche Durchführung der Trennung von Proteinen mit dieser Methode eine speziell auf die untersuchte Probenmatrix abgestimmte Prozedur und eine Auswahl geeigneter Reagenzien erfordert.

Die isoelektrische Fokussierung der Proteine von *P. aeruginosa* wird dabei häufig nur beiläufig erwähnt (z. B. Hanna et al., 2000), obgleich sie ein entscheidender Schritt in der 2D-GE ist. Sie wird oft mit recht rapider Spannungssteigerung durchgeführt

(Sauer und Camper, 2001). Der Umfang kann dabei relativ stark variieren. Häufig werden relativ geringe Fokussierungsumfänge angewendet, wie etwa 30 kVh (Nouwens et al., 2000) oder 35 kVh (Sauer und Camper, 2001), allerdings sind auch Werte von ca. 90 kVh (Hanna et al., 2000) bis zu 250 kVh (Sriramulu et al., 2005) beschrieben worden. Nach Herstellerangaben werden für 18 cm lange IPG-Streifen ca 60 kVh benötigt.

Der verwendete IEF-Puffer hat dabei meist unterschiedliche Zusammensetzungen. Es werden weit verbreitete Rezepturen, wie z. B. von Vilain et al. (2003) benutzt sowie Abweichungen davon, in denen das Reduktionsmittel oder das Detergenz ausgetauscht werden. Es existiert in der Literatur kein einheitliches Protokoll zur Fokussierung von Proteinen von *P. aeruginosa*.

Untersuchungen extrazellulärer Proteine verschiedener nicht-mucoider Stämme von *P. aeruginosa* in Flüssigkulturen mit planktonischen Zellen ergaben, dass die Hauptmenge der Proteine einen isoelektrischen Punkt zwischen pH 4 und 8 besitzt (Nouwens et al., 2002).

Auch für die zweite Dimension der Gelelektrophorese werden unterschiedliche Trennsysteme verwendet. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels kann sowohl konstant (z. B. Sauer und Camper, 2001) oder innerhalb eines Gradienten ansteigend gewählt werden (Nouwens et al., 2000), was einen Kompromiss aus unterschiedlichen Vernetzungsgraden des Polyacrylamid darstellt und häufig eine bessere Auflösung niedermolekularer als auch hochmolekularer Proteine bewirkt.

Die Detektion der Proteinspots extrazellulärer Proteine findet in der Literatur meist mittels zweier unterschiedlicher Methoden statt. Sowohl die Färbung mit Coomassie Brilliantblau als auch die Färbung mit Silber sind weit verbreitet. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen (Nouwens et al., 2003) hat sich trotz der Vorteile der guten Quantifizierbarkeit und der geringen Nachweisgrenze noch nicht weitläufig durchgesetzt.

Die Zusammensetzung dieser verschiedenen untersuchten EPS-Lösungen unterscheidet sich jedoch stark von den in dieser Arbeit verwendeten Proben, denn in keinem Fall ist mit mucoiden *P. aeruginosa*-Stämmen gearbeitet worden. Deshalb musste für die analysierten Proben dieser Arbeit das Protokoll für die 2D-GE komplett neu entwickelt werden.

5.6 Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese in dieser Arbeit

Zur Verbesserung der Solubilisierung während der IEF wurde in dem in dieser Arbeit verwendeten Puffer Tributylphosphin (TBP) als Reduktionsmittel verwendet (Herbert et al., 1998). Um das Trennergebnis weiter zu verbessern wurde Thioharnstoff in Verbindung mit Harnstoff eingesetzt, wie von Rabilloud et al. (1998) beschrieben, was eine weiter verbesserte Proteinsolubilisierung zur Folge hat.

Für die verwendeten Proben hat sich die Silberfärbung als geeignete Färbemethode herausgestellt, da sie die notwendige Empfindlichkeit hat um die extrazellulären Proteine anzufärben. Obwohl eine große Menge Protein aufgegeben wurde (ca. 1,5 mg pro IPG-Steifen), war die Anfärbung nur auf diesem Wege für eine größere Spotanzahl erfolgreich. Mit Coomassie Brilliantblau konnten bei dieser aufgegebenen Probemenge nur sehr wenige Proteinspots erkannt werden (Gele nicht gezeigt).

Um die Anfärbung mit Coomassie erfolgreich gestalten zu können, wurden etwa 5 mg Protein auf einen IPG aufgetragen. Auf diesem Wege gelang es aber nicht, alle Proteinspots, die nach Silberfärbung erkennbar waren, zu visualisieren. In Abb. 33 ist ein Bild eines mit Coomassie-Brillantblau gefärbten Gels im Vergleich zu einem mit Silber gefärbten Gel gezeigt.

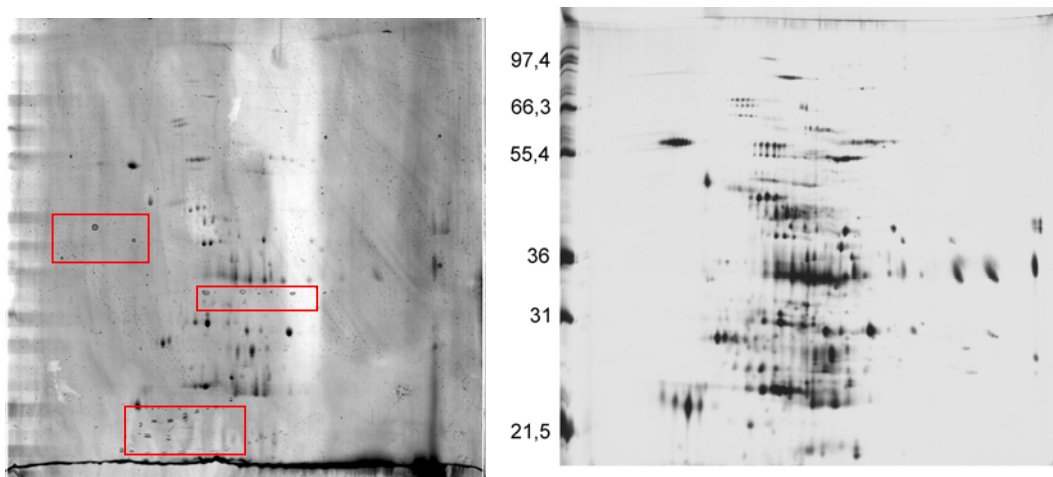


Abb. 33 Vergleich zwischen einem mit Coomassie-Brillantblau gefärbten (links) und einem mit Silber gefärbten 2D-Gel (rechts) extrazellulärer Proteine von 48 h alten, auf PIA gewachsenen Biofilmen von *P. aeruginosa* nach Bebrütung bei 36 °C. Es wurde jeweils ein IPG-Streifen des Bereichs pH 3-10 verwendet. Es handelt sich um 9 mg (links) und 2,5 mg Lyophilisat (rechts) von zellfreier EPS nach Dialyse und Ultrafiltration. Trotz der deutlich geringeren Proteinmenge ist die Anzahl an visualisierten Proteinspots mit Silberfärbung etwas größer.

Das in Abb. 33 auf der linken Seite gezeigte Bild des mit Coomassie Brilliantblau gefärbten Gels zeigt im mittleren und linken Bildbereich Artefakte (helle Bereiche),

welche durch die extreme Kontrastverstärkung mit der Software zur Gelauswertung (PD-Quest) entstehen. Viele jetzt erkennbare Proteinspots sind mit dem bloßen Auge kaum wahrnehmbar. Einige geringe Ablagerungen auf dem Gel (mit rotem Rahmen markiert) sind im Gel visuell deutlich von Proteinspots zu unterscheiden, werden aber durch die Software auch verstärkt dargestellt. Da die Erfolgsquote der isoelektrischen Fokussierung mit einer so großen aufgegebenen Probenmenge recht gering war, wurde diese Färbemethode nur in Ausnahmefällen (zur massenspektrometrischen Analyse) angewendet.

Die Färbung mit Silber ist erfolgreich, obwohl die aufgetragene Proteinmenge die vom Hersteller der IPG-Streifen angegebene maximale Menge an aufgetragenem Protein (ca. 1 mg bei Coomassiefärbung) überschreitet. Dies lässt entweder darauf schließen, dass der verwendete Proteinbestimmungsassay nach Lowry die tatsächlich vorhandene Proteinmenge überschätzt, oder aber, dass andere Effekte zum Tragen kommen, welche die effektive Anfärbbarkeit der Proteine herabsetzen. Dies können zum einen Effekte sein, die auf präparativen Umständen beruhen und den Verlust von Proteinen beinhalten (Zuo und Speicher, 2000). So können Proteine im Schritt der Rehydratation der IPG-Streifen nicht ganz ins Gel übergehen und im Tray verbleiben oder aber beim Übergang zur zweiten Dimension nicht vom Gel des IPG-Streifens auf das Trenngel migrieren.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass einige Peptide zwar eine kleine Molekülgröße haben, aber aufgrund der Wechselwirkungen mit Polysacchariden nicht durch Dialyse zu entfernen sind. Bei den Gelen sind an der unteren Laufkante (größtenteils nicht mehr auf den Abbildungen zu sehen) relativ starke Färbungen zu sehen, welche die Anwesenheit solcher niedermolekularen Proteinbruchstücke vermuten lässt. Da in den EPS aktive Proteasen nachweisbar sind, ist die Anwesenheit dieser kleinen Spaltprodukte der sekretierten Proteine gut möglich.

Die Vergleichbarkeit der Quantifizierungsmethoden der Proteine im Biofilm ist im Vorfeld durchgeführt worden (Broekman, 2000) und ergab, dass Analysen, die mit dem Bradford-Assay durchgeführt wurden, nur zwischen 4 % (extrazelluläre Proteine) bis 40 % (Biofilmsuspensionen mit Bakterienzellen) des Wertes nachwiesen, die mit dem Assay nach Lowry bestimmt wurden. Es wurde dabei angenommen, dass durch den Assay nach Bradford die wahre Proteinmenge unterschätzt wird. Da durch den Assay nach Lowry aber auch kleine Spaltprodukte erfasst werden und der Assay nach Bradford erst Peptide mit einer größeren

Kettenlänge erfasst, gewinnt die Hypothese der kleinen, an den Polysacchariden gebundenen Peptide in den EPS von *P. aeruginosa* SG81 weiter an Bedeutung.

Bei der Untersuchung des Sekretoms (Gesamtheit der sekretierten Proteine) von *P. aeruginosa* SG81 im Biofilm mit einem IPG-Streifen des pH-Bereichs 3-10 sind mit Silberfärbung über 100 distinkte Proteinspots erkennbar. Nouwens et al (2002) gelangen bei der Untersuchung der extrazellulären Proteine zweier *P. aeruginosa*-Stämme die Darstellung einer größeren Anzahl (ca 160) an Proteinspots. Auch Wehmhöner et al. (2003) konnten dies für 3 unterschiedliche *P. aeruginosa*-Stämme zeigen. Es zeigte sich dabei, dass sich die untersuchten Stämme untereinander recht stark im sekretierten Proteinprofil unterschieden. In der Veröffentlichung von Sriramulu et al. (2005) wurden hingegen weniger, dafür stärker ausgeprägte extrazelluläre Proteinspots nachgewiesen.

Einige der in dieser Arbeit gefundenen Proteinspots sind von der Lage her identisch mit denen des Stamms PAO1, welcher allerdings in einer Flüssigkultur gezüchtet wurde. Viele zeigen jedoch keine Übereinstimmung zu den in der Literatur gezeigten Proteinen. Das Sekretom des im Biofilm gewachsenen *P. aeruginosa* unterscheidet sich also recht stark von den planktonischen Sekretomen der in der Literatur beschriebenen Stämme.

Beim Vergleich der extrazellulären Proteine mit den Proteinen der äußeren Membran zeigt sich, dass mit den beschriebenen Methoden der Proteinisolierung unterschiedliche Proteinprofile erzeugt werden. Dennoch sind wahrscheinlich auch einige Proteine aus der äußeren Membran (OM) in den EPS zu finden, da einige Spots eine vergleichbare Lage in den erzeugten Gelen der Proteine der OM wie auch der EPS besitzen. In der Literatur wird meist bei der Isolierung nicht zwischen Proteinen der äußeren und der inneren Membran unterschieden, sondern generell von Membranproteinen berichtet. Die Profile der untersuchten Proteine der Membranen planktonischer Bakterien unterscheiden sich ebenfalls stark von den Profilen der sekretierten Proteine (Sriramulu et al., 2005).

Die Untersuchung der Veränderung des Sekretionsprofils wurde mit Biofilmen durchgeführt, deren Alter bis zu 72 h betrug. Die intrazelluläre Veränderung des Proteoms von *P. aeruginosa* im Verlauf der Biofilmentwicklung wurde von Sauer et

al. (2002) beschrieben. Es konnten damit verschiedene Phasen der Biofilmentwicklung bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch Veränderungen im Profil der Proteine erkennbar sind, die von den Zellen sekretiert werden. Das Biofilmalter wurde deshalb gering gewählt, damit der Effekt der Lyse der gewachsenen Zellen das Ergebnis nicht verfälscht. Voruntersuchungen ergaben, dass innerhalb von 72 h Biofilmwachstum wahrscheinlich keine Zelllysis auftritt. Dies wurde anhand des Nachweises des strikt intrazellulären Markerenzym Glucose-6-phosphat-dehydrogenase überprüft. Es konnte in den EPS nicht nachgewiesen werden (Balters 2000).

Innerhalb des Sekretoms des Biofilms vom mucoiden *P. aeruginosa* SG81 konnten Veränderungen bei ansteigendem Biofilmalter nachgewiesen worden. Es zeigte sich allerdings, dass die Veränderungen nur recht geringfügig ausfielen. Innerhalb des gewählten Bebrütungszeitraums war die Veränderung im Sekretom fließend, eine starke Veränderung trat nicht auf. Wehmhöner et al. (2003) beschrieben eine starke Veränderung des Sekretoms bei Vergleichen von Flüssigkulturen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase sowie der späten exponentiellen Phase. Eine hohe Anzahl an nachgewiesenen cytoplasmatisch lokalisierten Proteinen sowie Proteinfragmenten wurde so interpretiert, dass hier zelllytische bzw. proteolytische Effekte eine Rolle spielen.

5.7 Abhängigkeit der Proteinexpression von Ca-Ionen im Nährmedium

Der Zusatz von Kalzium verändert die mechanischen Eigenschaften des Biofilms immens. Durch die verbrückenden zweiwertigen Ionen wurde die Stabilität des Biofilms erheblich verstärkt (Körstgens et al., 2001; Wloka et al., 2006). Unter diesen Rahmenbedingungen wurde die Expression extrazellulärer Proteine untersucht. Es zeigte sich, dass die Unterschiede im Sekretionsprofil zu einem Biofilm ohne Kalziumzusatz gering ausfallen. Die in Abb. 27 unten markierten Proteinspots stammen wahrscheinlich von Proteinen der äußeren Membran, da bei der 2D-GE-Analyse der OM-Proteine an ähnlicher Stelle Proteinspots im Gel zu finden sind. Dies ist ohne Kalziumzusatz erst ab 48 h Bebrütung zu erkennen. Möglicherweise löst die bei der Isolierung der Proteine hinzugesetzte Menge EDTA Bestandteile der Membran ab. Eine Möglichkeit Membranproteine von *P. aeruginosa* zu isolieren, geschieht unter Zusatz von EDTA (Rogers et al., 1969). Die im oberen Bereich der

Abb. 27 vorhandenen Proteinspots sind ohne Kalziumzusatz nicht nachweisbar. Es gelang bis jetzt nicht, diese Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

Die Anfärbbarkeit der Proteinspots der verwendeten Proben ist geringer als die der Proben ohne Kalziumzusatz. Durch die Verbrückung der Alginatmoleküle sind unlösliche Kalziumalginat entstanden. In diesen Bereichen sind wahrscheinlich Proteine eingeschlossen, welche mit der verwendeten Isolationsmethode nicht extrahiert werden konnten.

5.8 Identifikation der Proteine

Nachdem es gelang, die Proteine mit der 2D-GE zu trennen, wurden massenspektrometrische Untersuchungen unternommen, um sie zu identifizieren. Die Analyse der Proteinspots war allerdings nur bei einer recht geringen Anzahl erfolgreich. Meistens war die Proteinmenge nicht ausreichend um ein aussagekräftiges Massenspektrum zu erhalten, welches über Datenbanken zur Identifikation führt. Teilweise wurden auch 2 Treffer für einen analysierten Proteinspot angegeben. Dies kann entweder bedeuten, dass hier zwei unterschiedliche Proteine nicht eindeutig elektrophoretisch getrennt wurden und so ein Gemisch beider Proteine analysiert wurde. Massenspektrometrisch können aber beide dann trotzdem nachgewiesen werden. Es ist aber ebenfalls möglich, dass es sich hierbei um Proteine handelt, welche stark homologe Aminosäuresequenzen besitzen. Daher erzeugen diese unterschiedlichen Proteine größtenteils identische Peptidfingerprints und können so massenspektrometrisch schlecht unterschieden werden. Auffällig ist, dass bei diesen drei Spots (2, 5 und 12) jeweils eines der identifizierten Proteine (COG2374 Extracellular nuclease GI 46164551; COG3487: Uncharacterized iron-regulated protein GI 46164834; COG0673: Predicted dehydrogenases and related proteins GI 53727418) aufgrund einer Änderung in der Literatur (Fehler in der vorherigen Analyse) der Genomzusammensetzung ein anderes Protein ersetzt hat. Die Identifikation dieser Proteinspots wurde aber mit Zugriffen auf aktuelle Datenbanken durchgeführt (GPS-Explorer, Applied Biosystems).

Die einzelnen identifizierten Proteine werden nun separat diskutiert. Dabei wird unterschieden in Proteine, welche wahrscheinlich im Cytoplasma der Zelle

vorzufinden sind, in Proteine, die wahrscheinlich periplasmatisch lokalisiert sind, in Membranproteine sowie in extrazelluläre Proteine.

5.8.1 Cytoplasmatisch lokalisierte Proteine:

Malatsynthase G [PA0482]: Score 115 (Spot 1)

Dieses Protein gehört dem Glyoxylatzyklus an, welcher als parallel zu dem Citratsäurezyklus stattfindender Zyklus bekannt ist (Nelson und Cox, 2001). Fettsäuren werden hierbei ab- und Kohlenhydrate aufgebaut. Dieses Protein hat eine vorhergesagte cytoplasmatische Lokalisation (Datenbank des Center for Biological Sequence Analysis Dänemark; online unter: www.cbs.dtu.dk). Extrazellulär ist dieses Protein bis jetzt in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Dihydrolipoamid-dehydrogenase GI 151345 Gruppe GI 494263 und GI 9947550.
Score 135 (Spot 3)

Als cytoplasmatisch vorhergesagtes Enzym wurde dieses Protein für *P. aeruginosa* bereits intrazellulär nachgewiesen (Hanna et al., 2000). Es wirkt bei der Energiegewinnung als Flavoproteinkomponente katalytisch für die oxidative Decarboxylation von Ketosäuren im Citratzyklus.

Chitinase GI 9948331: Score 98 (Spot 4), 103 (Spot 6), 80 (Spot 16)

Obwohl diesem Protein theoretisch eine cytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt wurde, konnte es im Periplasma nachgewiesen werden (Sriramulu et al., 2005). Auch die Sekretion dieses dem Kohlenhydratmetabolismus zugehörigen Enzyms ist beschrieben (Folders et al., 2001). Damit ist es dem Bakterium wahrscheinlich möglich, chitinhaltige Organismen (beispielsweise Crustacea und Pilze) bzw. deren Überreste als Kohlenstoffquelle zu benutzen.

5.8.2 Periplasmatisch lokalisierte Proteine:

Thiol: disulfide interchange protein DsbA Precursor GI 4545238: Score 44 (Spot 11)

Dies ist Vorstufe des periplasmatischen Enzyms, welches bei der Typ III Sekretion die Faltung der Proteine durch Bildung von Disulfidbindungen katalysiert (Ha et al., 2003). Es wurde extrazellulär von Nouwens et al. (2002, 2003) gefunden. Da es bei Nouwens et al. (2002) an gleicher Stelle im Gel identifiziert worden ist, ist es deshalb

auch hier, trotz des geringen Scores in der Datenbank, sehr wahrscheinlich nachgewiesen.

Probable periplasmic binding protein GI 9951454: Score 64 (Spot 15)

Obwohl theoretisch extrazellulär lokalisiert, wurde es bei der Benennung als periplasmatisches Protein angesehen. Es dient dem allgemeinen Stofftransport von verschiedenen Stoffen wie Aminosäuren, Peptiden und Zuckern (www.ncbi.nlm.nih.gov). Es wurde extrazellulär von Nouwens et al. (2002) nachgewiesen sowie periplasmatisch von Sriramulu et al. (2005).

COG2358: TRAP-type uncharacterized transport system, periplasmic component [*Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14] GI 53726882: Score 64 (Spot 19)

Dieses Transportprotein ist extrazellulär nicht beschrieben worden und wahrscheinlich periplasmatisch lokalisiert. TRAP-Transporter Proteine sind in verschiedenen gram-negativen Bakterien periplasmatisch zu finden (Forward et al. 1997).

COG0252: L-asparaginase/archaeal Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase subunit D [*Pseudomonas aeruginosa* 2192] GI 84328273: Score 136 (Spot 18)

Vermutlich handelt es sich hierbei um ein periplasmatisches Enzym, in der Literatur ist es noch nicht extrazellulär beschrieben worden. Es wird bei der Translation, also der Umsetzung der genomischen Information in Proteine, benötigt.

5.8.3 Membranproteine

Insulin-cleaving metalloproteinase outer membrane precursor GI 9950599: Score 112 (Spot 5)

Als ein Membranprotein identifiziertes Protein (Fricke et al., 1999), zeigt es eine andere Substratspezifität als die anderen bekannten Proteasen von *P. aeruginosa*. Es ist auch keine große Ähnlichkeit in seiner Aminosäuresequenz zu anderen Proteasen zu finden. Als membranlokalisiertes Protein wurde es von Sriramulu et al. (2005) nachgewiesen. Proteasen sind sowohl Virulenzfaktoren und dienen auch der Nährstoffaufnahme.

COG2885: Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo-) proteins GI 32041851: Score 64 (Spot 14)

Das Protein der äußeren Membran zeigt in der Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zur Domäne der OprF Membranproteine, welche Poren bilden. Es ist extrazellulär noch nicht beschrieben.

5.8.4 Extrazellulär lokalisierte Proteine:

Hypothetisches Protein [PA3909]: Score 121 (Spot 2)

Diesem Protein wird in der Datenbank des NCBI die Funktion einer extrazellulären Nuklease zugeordnet. Die Lokalisation ist extrazellulär vorhergesagt. Die Aminosäuresequenz ist sehr ähnlich wie die der Endonuklease GI 46164551.

COG2374 Extrazelluläre Nuklease GI 46164551: Score 111 (Spot 2)

Dieses extrazelluläre Protein baut Nukleinsäuren ab. Bakterien sind in der Lage, extrazelluläre Nukleinsäuren als Energiequelle zu nutzen (Finkel und Kolter, 2001). Im Biofilm konnte für den untersuchten Stamm *P. aeruginosa* SG81 DNase-Aktivität extrazellulär nachgewiesen werden (Grobe et al., 1995).

COG3487: Uncharacterized iron-regulated protein GI 46164834: Score 113 (Spot 5)

Dieses Protein zeigt große Homologien in der Aminosäuresequenz zur Proteinase GI 9950599, es dient aber wahrscheinlich dem Transport und dem Metabolismus von anorganischen Ionen (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Chain A Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* with an Inhibitor GI 52695999: Score 100 (Spot 7)

Die Elastase ist ein weiterer proteolytisch aktiver Virulenzfaktor. Es handelt sich bei den Untersuchungen von Nouwens et al. (2002, 2003) um ein im Sekretom dominierendes Protein, auch Sriramulu et al. (2005) beschreiben es als Protein, welches stark sekretiert wird. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass auch der hier untersuchte Stamm relativ viel Elastase auszuschcheiden scheint, da in dem von Nouwens et al. (2002) beschriebenen Bereich im Gel die stärkste Färbung auftrat, welche auch schon nach kürzester Zeit der Entwicklung der Silberfärbung zu sehen ist.

Arginine/ornithine binding protein AotJ GI 9946788: Score 144 (Spot 9), 68 (Spot 8)

Dieses Protein dient dem Aminosäure- und Peptidtransport. Es ist theoretisch extrazellulär lokalisiert, was auch in der Literatur so bestätigt wurde (Nouwens et al. 2002, 2003). Lediglich Sriramulu et al. (2005) beschreiben die Lokalisation dieses Proteins als periplasmatisch.

Probable TonB-dependent receptor GI 9951841: Score 81 (Spot 10)

Das TonB-System Gram-negativer Bakterien ist dafür verantwortlich, die protonmotorische Kraft, welche in der cytoplasmatischen Membran erzeugt wird, zur äußeren Membran zu leiten um die Eisenaufnahme mit Siderophoren zu ermöglichen. Dieses Rezeptorprotein hat eine theoretische Lokalisation als extrazelluläres Protein und wurde auch extrazellulär von Nouwens et al. (2002) beschrieben.

COG0673: Predicted dehydrogenases and related proteins GI 53727418: Score 158 (Spot 12)

Aufgrund von Homologien zu anderen Proteinen wurde diesem Protein die enzymatische Aktivität einer Dehydrogenase vorhergesagt. Es zeigt teilweise große Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zu dem hypothetischen Protein PA0943. Diese Dehydrogenase ist in der Literatur noch nicht extrazellulär beschrieben worden.

Hypothetical protein PA0943 GI 9946848: Score 150 (Spot 12)

Dieses Protein ist von Nouwens et al. (2002) extrazellulär nachgewiesen worden, auch seine theoretische Lokalisation ist extrazellulär. Es konnte noch keine Funktion für dieses Protein vorhergesagt werden.

Chitin-binding Protein CbpD Precursor GI9946749 Gruppe CbpD GI 6466167: Score 76 (Spot 13)

Die Vorstufe des Chitinbindeprotein-D ist theoretisch extrazellulär lokalisiert und wurde von Nouwens et al. (2002) extrazellulär nachgewiesen. Erstmals identifiziert von Folders et al. (2000) ist die Funktion dieses Protein unklar, es wird über den Typ-II-Sekretionsmechanismus ausgeschleust, wahrscheinlich nur bei hoher Zelldichte.

Die Funktion als Adhäsion bei der Besiedelung eukaryotischer Zellen wird diskutiert (Folders et al, 2000).

Sulfate-binding protein of ABC transporter [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1] GI 9947448: Score 121 (Spot 17)

Für den anorganischen Stofftransport dient dieses von Nouwens et al. (2002) extrazellulär gefundene Protein. Obwohl es theoretisch extrazellulär lokalisiert ist, wurde es von Sriramulu et al. (2005) im Periplasma identifiziert. Da diese Transportsysteme membrangebunden sind, ist eine zelluläre Lokalisation anzunehmen.

Sulfate-binding protein precursor [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1] GI 9946126: Score 124 (Spot 20)

Extrazellulär ist dieses Protein von Nouwens et al. (2002) identifiziert worden und dient wahrscheinlich dem anorganischen Stofftransport.

Branched-chain amino acid transport protein BraC [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1] GI 9946990: Score 143

Dieses Transportprotein ist von Hoshima und Kose (1989) erstmals genau identifiziert worden und dient dem Transport von Aminosäuren, welche aliphatische Seitenketten besitzen. Es konnte von Nouwens et al. (2002) extrazellulär sowie Sriramulu (2005) periplasmatisch nachgewiesen werden.

5.9 Interpretation der gefundenen Proteine:

Die extrazelluläre Anwesenheit von einem Chitinbindeprotein in Kombination mit einer Chitinase verstärkt die früher schon aufgekommenen Vermutungen, dass es dem Bakterium durch das Bindeprotein ermöglicht wird, auf chitinhaltigen Oberflächen wie z. B. Pilzen und Plankton Biofilme zu bilden. Der Transport von *P. aeruginosa* mit diesen Lebewesen ist denkbar. Die Kopplung der Expression dieses Proteins mit dem Quorum Sensing System (Folders et al., 2000) unterstützt eine Biofilmbildung auf diesen Oberflächen. Durch die ebenfalls extrazellulär vorliegende Chitinase kann die Oberfläche dabei auch lysiert und dem eigenen Stoffwechsel der Zelle zugeführt werden.

5.9.1 Membranvesikel

Einige extrazellulär vorliegende, identifizierte Proteine haben eine theoretische Lokalisation innerhalb der Zelle. Eine Sekretion der gefundenen, theoretisch cytoplasmatisch oder periplasmatisch lokalisierten Proteine ist nur in wenigen Fällen in der Literatur beschrieben. In den EPS konnte das intramolekulare Markerenzym Glucose-6-phosphat-dehydrogenase nicht nachgewiesen werden, deshalb ist eine Zell-Lysis recht unwahrscheinlich. Das extrazelluläre Vorkommen dieser Proteine kann aber dennoch erklärt werden:

Bis jetzt war es für den untersuchten Bakterienstamm noch nicht gelungen, die Bildung von Membranvesikeln im Biofilm nachzuweisen. Neueste Untersuchungen des Biofilms und der daraus gewonnenen EPS (nach der in dieser Arbeit aufgeführten Isolierungsprozedur) konnten die Anwesenheit von Membranvesikeln nachweisen (Broekman et al., in Vorbereitung). Dies sind, wie in Abb. 34 schematisch dargestellt, Ausbuchtungen der Membranen, welche mit intrazellulärem Material wie Enzymen und DNA gefüllt sein können. Diese Ausbuchtungen schnüren sich komplett ab, können sich von der Zelle entfernen und sind so im extrazellulären Raum als sphärische Gebilde nachweisbar.

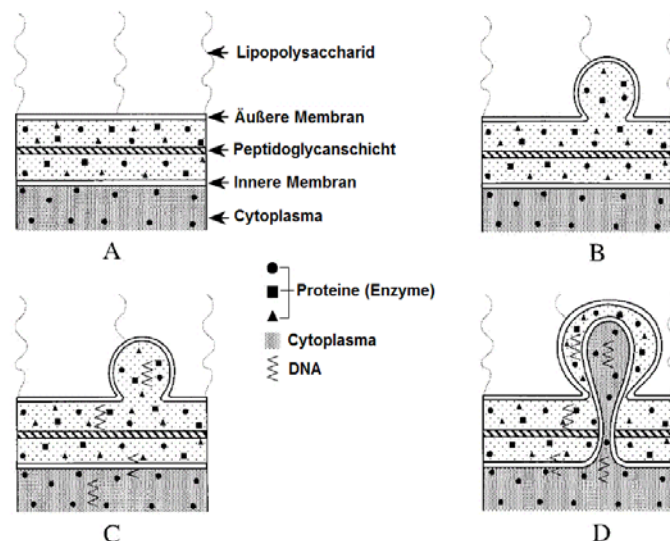


Abb. 34 Schematische Darstellung der Bildung von Membranvesikeln. Eine Gram-negative Bakterienzelle (A) erzeugt eine Ausbuchtung der äußeren Membran, welche sich mit periplasmatischem Material (B), DNA (C) sowie cytoplasmatischem Material (D) füllt (nach Kadurugamuwa und Beveridge, 1995).

Fluoreszenzmikroskopische sowie rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Strathmann (2003) deuteten zwar an, dass Membranvesikel im Biofilm sowie in den isolierten EPS von *P. aeruginosa* SG81 vorhanden sein könnten, der eindeutige Nachweis konnte bis jetzt jedoch nicht erbracht werden. Es konnten dabei mit Hilfe lipid- und proteinselektiver Farbstoffe relativ kleine Partikel visualisiert werden. Nach fraktionierter Filtration waren ebenfalls Partikel auf einem Polycarbonatfilter der Porengröße 0,05 µm mit dem Rasterelektronenmikroskop erkennbar.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnten diese sphärischen Gebilde nun eindeutig im Biofilm als Membranvesikel nachgewiesen werden (Abb. 35). Sie sind auch noch intakt in den extrahierten EPS erkennbar (Abb. 36).

Die Abschnürung von Membranvesikeln ist damit unter anderem als Mechanismus zur Sekretierung von Proteinen für einen mucoiden *P. aeruginosa*-Stamm nachgewiesen.

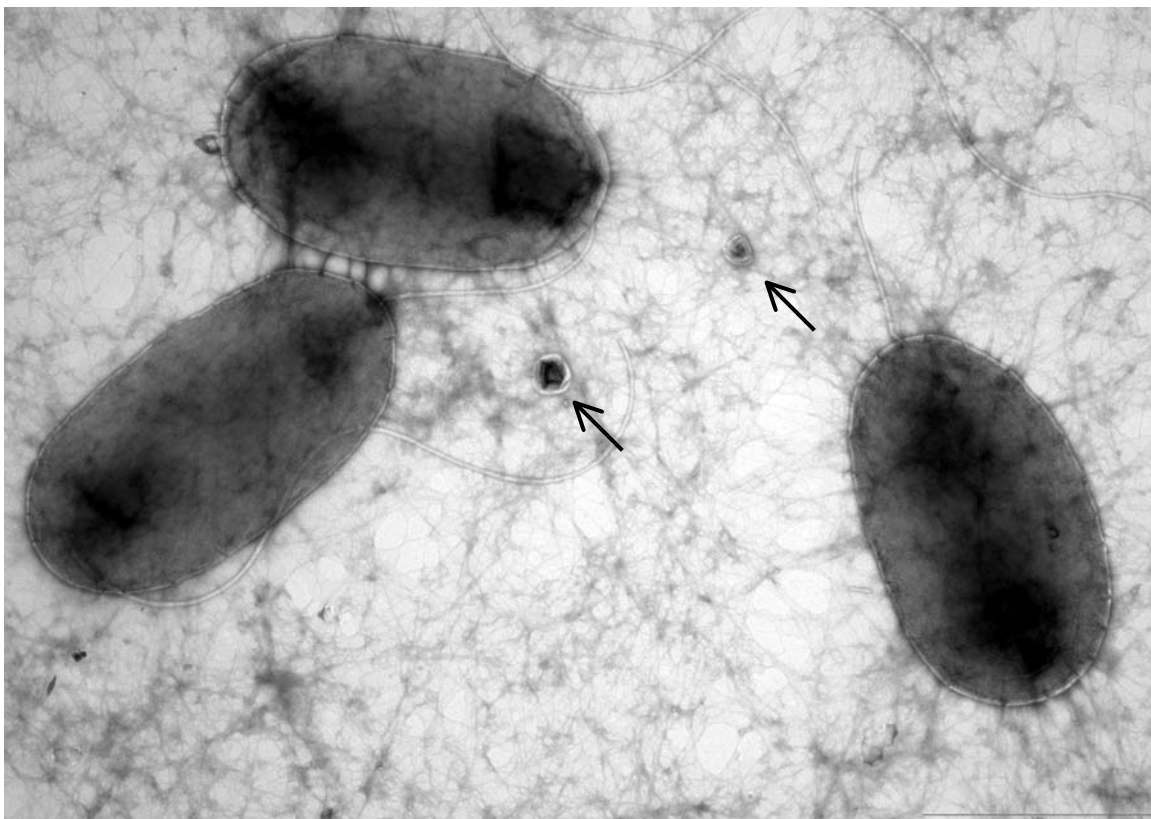


Abb. 35 TEM-Aufnahme eines Biofilms von *P. aeruginosa* SG81. Erkennbar sind Bakterienzellen sowie mit Pfeilen markierte sphärische Membranvesikel (Broekman et al., in Vorbereitung). Der Maßbalken hat eine Länge von 1 µm.

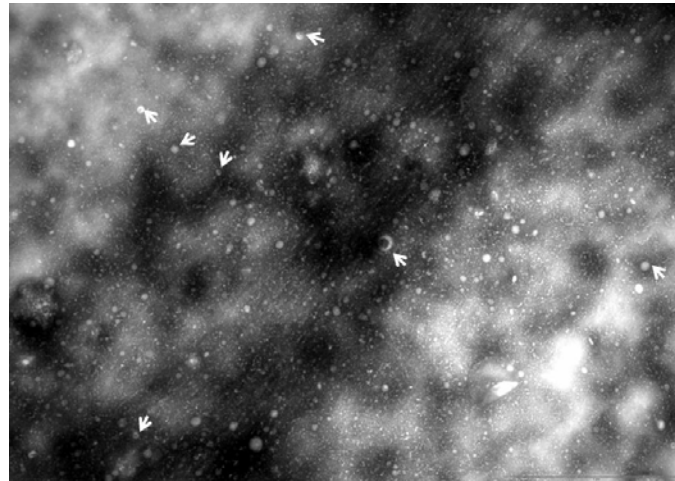


Abb. 36 TEM-Aufnahme der EPS eines Biofilms von *P. aeruginosa* SG81. Die Pfeilen markieren die in der Lösung durch Ultrazentrifugation angereicherten Membranvesikel (Broekman et al., in Vorbereitung). Der Maßbalken hat eine Länge von 1 μm .

5.10 Fazit

Die methodische Herausforderung dieser Arbeit lag in der Darstellung des extrazellulären Proteoms innerhalb einer kohlenhydratreichen Matrix. Es gelang dabei eine Methode zu entwickeln, die Analytik der Proteine in den EPS eines mucoiden *P. aeruginosa* mittels 2D-GE zu ermöglichen. Dazu musste das in den EPS hauptsächlich vorhandene Polysaccharid Alginat entfernt werden, weil es durch seinen polyelektrolytischen Charakter und der Bildung von Protein-Kohlenhydrat-Komplexen die Analyse stört. Es zeigte sich, dass sich das Sekretom des Biofilms von den in der Literatur veröffentlichten planktonischen Sekretomen von *P. aeruginosa* in vielen Bereichen unterscheidet. Nach erfolgreicher Trennung gelang es eine Reihe an extrazellulär vorliegenden Proteinen massenspektrometrisch zu identifizieren. Diese Proteine haben theoretisch eine cytoplasmatische, periplasmatische oder in den Membranen liegende Lokalisation. Es gelang daraufhin mit TEM-Aufnahmen des Biofilms und der isolierten EPS der Nachweis der Bildung von Membranvesikeln als einen weiteren Proteinsekretionsmechanismus mucoider Stämme von *P. aeruginosa*.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Proteinsekretion im Biofilm zwischen 24 und 72 h Biofilmalter ergab nur geringe Unterschiede im Sekretionsmuster. Durch Kalziumzusatz im Nährmedium konnten ebenfalls geringe Unterschiede im Sekretionsmuster nachgewiesen werden.

5.11 Ausblick

Durch die Entwicklung der Methode zur Darstellung des extrazellulären Proteoms im Biofilm wurde ein Werkzeug geschaffen, welches es ermöglicht, Veränderungen im Sekretom durch verschiedene Umwelteinflüsse zu untersuchen.

Die komplette Identifikation der extrazellulär vorliegenden Proteine wird es ermöglichen, das Verständnis des Phänomens Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* weiter zu festigen. So können dann die Unterschiede im Sekretionsmuster besser interpretiert werden.

Durch den Nachweis der Anwesenheit von Membranvesikeln im Biofilm ist nun eine gezielte Untersuchung dieser Gebilde und deren Funktion im Biofilm mucoider *P. aeruginosa* Stämme möglich.

Die Methode des Abtrennens hochmolekularer Polysaccharide kann auch für andere natürliche Biofilme modifiziert werden und erlaubt dann deren Sekretomanalyse.

6 Literatur

- Aebersold, R.; Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207
- Allan, N. D.; Kooi, C.; Sokol, P. A.; Beveridge, T. J. (2003) Putative virulence factors are released in association with membrane vesicles from *Burkholderia cepacia*. *Can. J. Microbiol.* 49, 613-624
- Allison, D. G. (1993) Biofilm associated exopolysaccharides. *Microbiol. Eur.* 1, 16-19
- Allison, D. G.; Sutherland, I. W.; Neu, T. R. (2003) EPS: What's an acronym? In: McBain, A.; Allison, D.; Brading, M.; Rickard, A.; Verran, J.; Walker, J. (Hrsg.): *Biofilm communities: Order from Chaos?* BioLine, Cardiff 2003, 381-387
- Bakke, R.; Characklis, W. G.; Turakhia, M. H.; Yeh, A.-I. (1990) Modelling a monopopulation biofilm system: *Pseudomonas aeruginosa* In: Characklis, W. G.; Marshall K. C. (Hrsg.) *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc., New York 487-521
- Balters, S. (2000) Charakterisierung von Proteinen als Bestandteile extrazellulärer polymerer Substanzen in Biofilmen, Diplomarbeit, Universität Duisburg
- Bermudez, A.; Daban, J.-R.; Garcia, J. R.; Mendez, E. (1994) Direct blotting, sequencing and immunodetection of proteins after five-minute staining of SDS and SDS-treated IEF gels with Nile Red. *Biotechniques* 16, 621-624
- Blomberg, A.; Blomberg, L.; Fey, S. J.; Larsen, P. M.; Roepstorff, P.; Degand, P.; Bountry, M.; Posch, A.; Görg, A. (1995) Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 1935-1945
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

- Botzenhart, K.; Döring, G. (1993) Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* In: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Campa, M.; Bendinell, M.; Friedmann H. (Hrsg.) Plenum Press, New York. 1-18
- Böckelmann, U.; Janke, A.; Kuhn, R.; Neu, T. R.; Wecke, J.; Lawrence, J. R.; Szewzyk, U. (2006) Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. FEMS Microb. Lett. 262, 31-38
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72, 248-254
- Branda, S. S.; Vik, S.; Friedman, L.; Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 13, 20-26
- Broekman, S. (2000) Charakterisierung der Proteine in den extrazellulären polymeren Substanzen von *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen. Diplomarbeit, Universität Duisburg
- Caballero, A. R.; Moreau, J. M.; Engel, L. S.; Marquart, M. E.; Hill, J. M.; O'Callaghan, R. J. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. Anal. Biochem. 290, 330-337
- Characklis, W. G.; Marshall, K. C. (1990) Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach. In: Characklis, W. G.; Marshall, K. C. (Hrsg.) Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, 3-15
- Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41, 435-464
- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; DeBeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D.; James, G. (1995) Biofilms, the customized microniche. J. Bacteriol. 176, 2137-2142.

- Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322
- DeBeer, D.; Stoodley, P.; Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotech. Bioeng.* 44, 636-641
- Decho, A. W.; Visscher, P. T.; Reid, P. R. (2005) Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Paleogeogr. Paleoclim. Paleoecol.* 219, 71-86
- Denkhaus, E.; Meisen, S.; Telgheder, U.; Wingender, J. (2007) Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchim. Acta* 158, 1-27
- Dockter, G.; Lindemann, H.; Tümmler, B.; Wunderlich, P.; Dittrich-Weber, H. (1997) *Mukoviszidose*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W. (2002) Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356
- Fazekas de St. Groth, S.; Webster, R. G.; Datyner, A. (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins in electrophoresis strips. *Biochim. Biophys. Acta* 71, 377-391
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C.; Carpita, N. C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197, 157-162.
- Filloux, A.; Michel, G.; Bally, M. (1998) GSP dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 177-198

- Finkel, S. E.; Kolter, R. (2001) DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriol.* 183, 6288-6293
- Flemming, H.-C. (1991) Biofilme und Wassertechnologien, Teil I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. *Wasser Abwasser* 132, 197-207
- Flemming, H.-C. (1995) Sorption sites in biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 32, 27-33
- Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2001) Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit* 31, 169-180
- Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2002) Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. In: Bitton, G. (Hrsg.) *Encyclopedia of Environmental Microbiology* vol. 3, 1223-1231
- Folders, J.; Tommassen, J.; van Loon, L. C.; Bitter, W. (2000) Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 1257-1263
- Folders, J.; Algra, J.; Roelofs, M. S.; van Loon, L. C.; Tommassen, J.; Bitter, W. (2001) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. *J. Bacteriol.* 183, 7044-7052
- Forward, J. A.; Behrendt, M. C.; Wyborn, N. R.; Cross, R.; Kelly, D. J. (1997) TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the dctPQM genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 179, 5482-5493
- Fricke, B.; Parchmann, O.; Kruse, K.; Rucknagel, P.; Schierhorn, A.; Menge, S. (1999) Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1454, 236–250.

- Frølund, B.; Palmgren, R.; Keiding, K.; Nielsen, P. H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.* 30, 1749-1758
- Galloway, D. R. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol. Microbiol.* 5, 2315 – 2321
- Gehrke, T.; Telegdi, J.; Thierry, D.; Sand, W. (1998) Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2743-2747
- Govan, J. R. W.; Harris, G. S. (1986) *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaption and pathogenesis. *Microbiol. Sci.* 3, 302-308
- Govan, J. R. W. (1990) Characteristics of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. In: Gacesa, P., Russell, N. J. (Hrsg.): *Pseudomonas* infection and alginates, Chapman and Hall, London 50-75
- Grobe, S.; Wingender, J.; Trüper, H. G. (1995) Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 94-102
- Ha, U.-H.; Wang, Y.; Jin, S. (2003). DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect. Immun.* 71, 1590-1595
- Hanna, S. L.; Sherman, N. E.; Kinter, M. T.; Goldberg, J. B. (2000) Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 146, 2495-2508
- Hausner, M.; Wuertz, S. (1999) High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in-situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710-3713

- Herbert, B. R.; Molloy, M. P.; Goley, A. A.; Walsh, B. J.; Bryson, W. G.; Williams, K. L. (1998) Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributylphosphine as a reducing agent. *Electrophoresis* 19, 845-851
- Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8, 67-113
- Higgins, M. J., Novak, J. T. (1997) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environ. Eng.* 123, 479-485
- Hoshino, T.; Kose, K. (1989) Cloning and nucleotide sequence of *braC*, the structural gene for the leucine-, isoleucine-, and valine-binding protein of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 171, 6300-6306
- Jacob-Dubuisson, F.; Locht, C.; Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* 40, 306-313
- Joubert, L.-M., Wolfaardt, G. M., Botha, A. (2006): Microbial exopolymers link predator and prey in a biofilm system. *Microb. Ecol.* 52, 187-197
- Kadurugamuwa, J. L.; Beveridge, T. J. (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177, 3998-4008
- Klausen, M. M.; Thomsen, T. R.; Nielsen, J. L.; Mikkelsen, L. H.; Nielsen, P. H. (2004) Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. *FEMS Microb. Ecol.* 50, 123-132
- Kok, R. G.; Christoffels, V. M.; Vosman, B.; Hellingwerf, K. J. (1993) Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J. Gen Microbiol.* 139, 2329-2342

- Körstgens, V.; Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Borchard, W. (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Wat. Sci. Technol. 43 (6), 49-57
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
- Lange, B.; Wingender, J.; Winkler, U. K. (1989) Isolation and characterization of an alginate lyase from *Klebsiella aerogenes*. Arch. Microbiol. 152, 302-308
- Larsen P.; Nielsen, J. L.; Dueholm, M. S.; Wetzel, R.; Otzen, D.; Nielsen, P. H. (Eingereicht) Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms.
- Lattner, D.; Flemming, H.-C., Mayer, C. (2003) ^{13}C -NMR Study on the interaction of bacterial alginate with bivalent cations. Int. J. Biol. Macromol. 33, 81-88
- Lee, W.-C.; Lee, K. H. (2004) Application of affinity chromatography in proteomics. Anal. Biochem. 324, 1-10
- Li, Z.; Clarke, A. J.; Beveridge, T. J. (1998) Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. J. Bacteriol. 180, 5478-5483
- Loeb, G. I.; Neihof, R. A. (1975) Marine conditioning films. Adv. Chem. 145, 319-335
- Lottspeich, F.; Zorbas, H. (1998) Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich, F.; Zorbas, H. (Hrsg); Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 217-253
- Loveless, B. J.; Saier, M. H. Jr. (1997) A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. Mol. Membr. Biol. 14, 113-123
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275

- Ma, L.; Jackson, K. D.; Landry, R. M.; Parsek, M. R.; Wozniak, D. J. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. J. Bacteriol. 188, 8213-8221
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (2001) Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Marty, N.; Dournes, J. L.; Chabanon, G.; Montrozier, H. (1992) Influence on nutrient media on the chemical composition of the exopolysaccharide from mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 98, 35-44
- Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. Int. J. Biol. Macromol. 26, 3-16
- Merril, C. R.; Switzer, R. C.; Van Keuren, M. L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4335-4339
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2001) Lehninger Biochemie. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 635
- Nouwens, A. S.; Willcox, M. D; Walsh, B. J.; Cordwell, S. J. (2002) Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Proteomics 2, 1325-1346
- Nouwens, A. S.; Beatson, S. A.; Whitchurch, C. B.; Walsh, B. J.; Schweizer, H. P.; Mattick, J. S.; Cordwell, S.J. (2003) Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology 149, 1311-1322

- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
- Palmgren, R.; Nielsen, P.H. (1996) Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. Wat. Sci. Technol. 34 (5), 233-240
- Pedersen, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. Wat. Res. 24, 239-243
- Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 18, 3551-3567
- Poxton, I. R.; Bell, G. T.; Braclay, G. R. (1985) The association on SDS-polyacrylamide gels of lipopolysaccharide and outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as revealed by monoclonal antibodies and western blotting. FEMS Microbiol. Lett. 27, 247-251
- Preiss, J.; Ashwell, G. (1962) Alginic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4- deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid. J. Biol. Chem. 237, 309-316
- Prestidge, L.; Gage, V.; Spizizien, J. (1971) Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 107, 815 - 823
- Phillips, I. (1969) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. J. Med. Microbiol. 2, 9-16
- Rabilloud, T.; Valette, C.; Lawrence, J. J. (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. Electrophoresis 15, 1552-1558

- Renelli, M.; Matias, V.; Lo, R. Y.; Beveridge, T. J. (2003) DNA containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150, 2161-2169
- Rice, K. C.; Mann, E. E.; Endres, J. L.; Weiss, E. C.; Cassat, J. E.; Smeltzer, M. S.; Bayles, K. W. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104, 8113-8118
- Rode, A. (2004) Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen. Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Rogers, S. W.; Gilleland, H. E.; Eagon, R. G. (1969) Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 15, 743-748
- Salyers, A. A.; Whitt, D. D. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and related species, a lesson in versatility. In: *Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach*. 2. Auflage, ASM Press, Washington, DC.
- Sauer, K.; Camper, A. (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* 183, 6579-6589
- Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154
- Schooling, S. R.; Beveridge, T. J. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 188, 5945-5957

- Schürks, N.; Wingender, J.; Flemming, H.-C.; Mayer, C. (2002) Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Biol. Macromol. 30, 105-111
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M.; (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68, 850-858
- Sivaraman, T.; Kumar, T. K. S.; Jayaraman, G.; Yu, C. (1997) The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. J. Prot. Chem. 16, 291-297
- Skjåk-Bræk, G.; Larsen, B.; Grasdalen, H. (1985) The role of O-acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. Carbohydr. Res. 145, 169-174
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Koeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85
- Späth, R.; Flemming, H.-C.; Wuertz, S. (1998) Sorption properties of biofilms. Wat. Sci. Tech. 37 (4) , 207-210
- Spettmann, D. (2002) Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Alginat aus Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa*, Diplomarbeit, Universität Duisburg
- Sriramulu, D. D.; Nimtz, M.; Romling, U. (2005) Proteome analysis reveals adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment. Proteomics 5, 3712-3721
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187-209

- Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M., Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R.E.; Lory, S; Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959- 964
- Straatmann, A.; Borchard, W. (2002) Determination of thermodynamic properties of sodium alginate from bacteria and seaweeds in aqueous solutions. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 119, 64-69
- Strathmann, M. (2003) Visualisierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen in Biofilmen. Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Sutherland, I. W. (1984) Microbial polysaccharides – their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10, 173-201
- Tielen, P. (2005) Einfluss extrazellulärer Enzyme auf die Struktur und die Eigenschaften von Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.E. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151, 1313–1323
- Tyers, M.; Mann, M. (2003) From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197
- Vilain, S.; Cosette, P.; Hubert, M.; Lange, C.; Junter, G.-A; Jouenne, T (2004) Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Anal. Biochem.* 329, 120-130

- Von Kampen, V. (1991) Isolierung und Charakterisierung von extrazellulärer Alginat-Lyase aus *Cytophaga* sp. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Wang, X.; Rochon, M.; Lamprokostopoulou, A.; Lünsdorf, H.; Nimtz, M.; Römling, U. (2006) Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. Cell. Mol. Life Sci. 63, 2352-2363
- Webb, J. S.; Thompson, L. S.; James, S.; Charlton, T.; Tolker-Nielsen, T.; Koch, B.; Givskov, M.; Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J. Bacteriol. 185, 4584-4592
- Wehmhöner, D.; Häussler, S.; Tümmler, B.; Jänsch, L.; Bredenbruch, F.; Wehland, J.; Steinmetz, I. (2003) Inter- and intracolonial diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. J. Bacteriol. 185, 5807-5814
- Weissbach, A.; Hurwitz, J. (1959) The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem. 234, 705-709
- Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K.L. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 13, 19-50
- Windhues, T.; Borchard, W. (2003) Effect of acetylation on physico-chemical properties of bacterial and algal alginates in physiological sodium chloride solutions investigated with light scattering techniques. Carbohydrate Polymers 52, 47-52
- Wingender, J.; Volz, S.; Winkler, U. K. (1987) Interaction of extracellular *Pseudomonas* lipase with alginate and its potential use in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27, 139-145

- Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.C. (Hrsg.): Microbial extracellular polymeric substances, Springer Verlag , Berlin, Heidelberg, New York, 1-19
- Wingender, J.; Strathmann, M.; Rode, A.; Leis, A.; Fleming, H.-C. (2001) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. Methods Enzymol. 336, 302-314
- Winkler, U.K.; Stuckmann, M. (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharide greatly enhanced the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 138, 663- 670
- Wloka, M.; Rehage, H.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2006) Structure and rheological behaviour of the extracellular polymeric substance network of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Biofilms 2, 275-283
- Wolfaard, G. M.; Lawrence, J. R.; Korber, D. R. (1999) Function of EPS. In: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. (Hrsg.): Microbial extracellular polymeric substances, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 171-200
- Yahr, T. L.; Goranson, J.; Frank, D. W. (1996) Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. Mol. Microbiol. 22, 991-1003
- Yang, L.; Barken, K. B.; Skindersoe, M. E.; Christensen, A. B.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 153, 1318-1328
- Yeo, H. J.; Waksman, G. (2004) Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. J. Bacteriol. 186, 1919-1926
- Zou, X.; Speicher, D. W. (2000) Quantitative evaluation of protein recoveries in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 21, 3035-3047

Anhang

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Broekman, Sascha
Adresse:	Uthmannstr. 16, 47057 Duisburg
Geburtsdatum:	26.06.1973
Geburtsort:	Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1979-1983	Gemeinschaftsgrundschule Blötter Weg
1983-1989	Realschule Broich, Abschluss: Fachoberschulreife

Zivildienst von 1992-1993 beim Caritasverband Mülheim an der Ruhr: Mobiler sozialer Hilfsdienst

Berufsausbildung:

1989-1992	Schulische Ausbildung in Mülheim an der Ruhr zum Chemisch-Technischen-Assistenten, Erlangung der Fachhochschulreife
1993-2000	Studium der Chemie an der Gerhard Mercator Universität Duisburg, Abschluss: Diplom-Chemiker (Diplom II), Wahlpflichtfach Wasserchemie
Seit 2000	Doktorand im Biofilm-Centre, Abteilung Aquatische Mikrobiologie Universität Duisburg-Essen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

“Etablierung der Methodik zur Darstellung des extrazellulären Proteoms in Biofilmen eines mucoiden Stammes von *Pseudomonas aeruginosa*”

selbst verfasst zu haben und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Duisburg, 31. August 2007

Sascha Broekman